

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



**Alteración de algunos metabolitos por variaciones dietarias
en el contenido de met + cis y energía en sangre y cerebro de
ratas**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Begoña de Arribas García

Director

José Luis Rey de Viñas Rodríguez

Madrid

ISBN: 978-84-8466-806-0

© Begoña de Arribas García, 1993

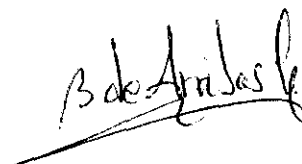
BEGOÑA DE ARRIBAS GARCIA

**"Alteración de Algunos Metabolitos por Variaciones Dietarias en el
Contenido de Met+Cis y Energía en Sangre y Cerebro de Ratas"**

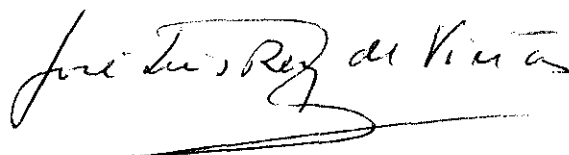
**DIRECTOR: Dr. Jose Luís Rey de Viñas Rodriguez
Investigador del C.S.I.C.**

**Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1993**

Begoña de Arribas García
aspirante al Grado de
Doctora en Farmacia



DIRECTOR:



Fdo.: Dr. Jose Luís Rey de Viñas

VºBº del Ponente y Profesor Titular del Departamento,



Fdo.: Dr. Fernando Ruiz

Este trabajo está integrado dentro del Proyecto N° ID 803 titulado: "Índices de malnutrición proteica en algunos órganos de rata por déficit dietario de aminoácidos esenciales" subvencionado por la Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología del C.S.I.C.

*El amor y los alimentos son igualmente vitales
para nuestra cordura y supervivencia.*

Ko Tsu

A mis padres

Es esta una oportunidad para poder mostrar la gratitud que se merecen todas aquellas personas que de un modo u otro me han prestado su atención en la realización de este trabajo.

En primer lugar agradecer al Dr. Jose Luís Rey de Viñas la confianza en mí depositada al aceptarme como colaboradora en su equipo. Su dedicación y larga experiencia en la investigación dejan florecer el interés diario que tanto se necesita.

He de recordar la gran labor directiva llevada a cabo en este Departamento por personas tan valiosas como la Dra. Ana María Requejo, Directora del Departamento de Nutrición, la Dra. M^a Pilar Navarro, Directora del Instituto de Nutrición y Bromatología del C.S.I.C. y el Profesor Gregorio Varela, Profesor Emérito. Todos ellos colaboran para que cada día el concepto y la importancia de la Nutrición estén más elevados en nuestra sociedad.

También dar las gracias por haber coincidido en los comienzos de este trabajo con M^a del Carmen Osuna, Nuria Aparicio y M^a Jesús Sanchez. Los ratos pasados formarán parte de una preciosa época llena de inquietudes.

Dedicar un espacio a quienes en un momento determinado cedieron su esfuerzo de forma desinteresada como la Dra. Elena Vara por su experta contribución en la determinación de la insulina, a la Srta. Carmen Bravo por su asesoramiento estadístico, Vicente López por su ayuda en la corrección de estilo y a Francisco Salas y Juan Carlos Gómez por su atención en la encuadernación de este trabajo.

Nombrar con gran afecto a Feliciano, Técnico de la casa que con la ayuda prestada bajo el telón colaboró en esta larga tarea.

Por último el agradecimiento más cálido hacia Elena, Paco, Juan Antonio, M^a Carmen, Resu, Roberto y Miguel.

A todos gracias

INDICE

1.- OBJETO, pág. 1

2.- SITUACION BIBLIOGRAFICA

2.1.- INTRODUCCION, pág. 4

2.2.- PROTEINAS Y ENERGIA, pág. 6

2.2.1.- Consideraciones previas, pág. 6

2.2.2.- Relación entre calidad y cantidad de proteína dietaria, ingesta calórica y utilización de nitrógeno, pág. 13

2.3.- METABOLISMO CEREBRAL, pág. 19

2.3.1.- Metabolismo cerebral de nutrientes, pág. 19

2.3.2.- Aminoácidos en el cerebro, pág. 24

2.3.3.- Efectos nutricionales sobre la biodisponibilidad de aminoácidos y desarrollo cerebral, pág. 43

2.3.3.1.- Consecuencias de una disponibilidad de aminoácidos inadecuada sobre la síntesis proteica y desarrollo cerebral, pág. 44

2.3.3.2.- Consecuencias de una disponibilidad de aminoácidos inadecuada sobre la síntesis de neurotransmisores y desarrollo cerebral, pág.45

2.3.4.- Aminoácidos azufrados en el desarrollo cerebral, pág. 47

2.3.5.- Influencia de la dieta sobre la función cerebral, pág. 49

2.4.- MALNUTRICION PROTEICO-ENERGETICA, pág. 54

2.4.1.- Generalidades, pág. 54

2.4.2.- Malnutrición proteica en el cerebro, pág. 58

2.4.3.- Malnutrición proteico-energética en el cerebro, pág. 60

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL, pág. 62

3.1.1.- Estudio de la carencia de met+cis en la dieta, pág.62

3.1.2.- Estudio de la carencia de met+cis en la dieta con restricción de la energía a la mitad, pág. 63

3.2.- DESARROLLO DEL EXPERIMENTO, pág. 64

3.2.1.- Composición de las dietas, pág. 66

3.2.1.1.- Dieta I o control con 10% de proteína, pág. 66

3.2.1.2.- Dieta II con 10% de proteína y carente de met+cis, pág. 67

3.2.1.3.- Dieta III con 20% de proteína, carente de met+cis y con la mitad de energía, pág. 68

3.3.- DETERMINACIONES ANALITICAS,	pág. 70
3.3.1.- Toma de muestras,	pág. 70
3.3.1.1.- Orina y heces,	pág. 70
3.3.1.2.- Sangre y cerebro,	pág. 70
3.3.2.- Preparación de las muestras,	pág. 71
3.3.2.1.- Determinaciones enzimáticas y de proteínas,	pág. 71
3.3.2.2.- Sangre,	pág. 71
3.3.3.- Sistema cromatográfico (HPLC),	pág. 71
3.3.4.- Técnicas empleadas,	pág. 73
3.3.4.1.- Balance de nitrógeno,	pág. 73
3.3.4.2.- Determinaciones en el homogenado de cerebro,	pág. 73
3.3.4.2.1.- Proteínas,	pág. 73
3.3.4.2.2.- DNA,	pág. 74
3.3.4.2.3.- RNA,	pág. 74
3.3.4.2.4.- DNAsa ácida,	pág. 75
3.3.4.2.5.- RNAsa ácida,	pág. 77
3.3.4.2.6.- Fosfatasa ácida,	pág. 78
3.3.4.2.7.- Fosfatasa alcalina,	pág. 79
3.3.4.2.8.- Beta-D- glucuronidasa,	pág. 79
3.3.4.2.9.- Glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT),	pág. 80
3.3.4.2.10.- Glutamato-piruvato-transaminasa (GPT),	pág. 81
3.3.4.3.- Determinaciones en plasma,	pág. 82
3.3.4.3.1.- Urea,	pág. 82
3.3.4.3.2.- Colesterol,	pág. 83
3.3.4.3.3.- Glucosa,	pág. 83
3.3.4.3.4.- Insulina,	pág. 84
3.3.4.3.5.- Proteínas totales,	pág. 86
3.3.4.3.6.- Fracciones proteicas,	pág. 86
3.3.4.3.7.- Aminoácidos libres,	pág. 87
3.3.4.4.- Determinaciones en orina,	pág. 91
3.3.4.4.1.- Urea,	pág. 91
3.3.4.4.2.- Creatinina,	pág. 91
3.3.4.5.- Tratamiento estadístico,	pág. 92

4.- RESULTADOS, pág. 93

5.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS, pág. 167

5.1.- MODELO DE ANIMALES APLICADOS A LA INVESTIGACION DE MALNUTRICION CEREBRAL, pág. 167

5.2.- EFECTO DE LA CARENCIA DE MET+CIS Y MET+CIS Y ENERGIA SOBRE LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL, pág. 168	
5.2.1.- Ingesta, pág. 168	
5.2.2.- Peso corporal, pág. 172	
5.3.- BALANCE DE NITROGENO, UREA Y NITROGENO UREICO EN PLASMA, UREA Y CREATININA EN ORINA, pág. 175	
5.3.1.- Balance de nitrógeno, pág. 175	
5.3.2.- Urea y nitrógeno ureico plasmáticos, urea y creatinina en orina, pág. 177	
5.4.- COLESTEROL, GLUCOSA E INSULINA PLASMATICOS, pág. 180	
5.4.1.- Colesterol, pág. 180	
5.4.2.- Glucosa e insulina, pág. 183	
5.5.- PROTEINAS TOTALES Y FRACCIONES PROTEICAS PLASMATICAS, pág. 186	
5.6.- EFECTO DE LA CARENCIA DE MET+CIS Y MET+CIS Y ENERGIA SOBRE EL CRECIMIENTO CEREBRAL, pág. 189	
5.6.1.- Modificaciones en el peso del cerebro, peso del cerebro/peso corporal y proteínas solubles del mismo, pág. 189	
5.6.2.- Variaciones en el DNA, proteínas/DNA, número de núcleos, tamaño celular y actividad DNAsa ácida, pág. 193	
5.6.3.- Variaciones en el RNA total, RNA/DNA, RNA/proteína y actividad RNAsa ácida, pág. 194	
5.6.4.- Efecto sobre las actividades enzimáticas de hidrolasas: Fosfatasas ácida y alcalina y beta-glucuronidasa, pág. 196	
5.6.5.- Efecto sobre las actividades enzimáticas de transaminasas, GOT y GPT, pág. 197	
5.7.- EFECTO DE LA CARENCIA EN LA DIETA DE MET+CIS Y MET+CIS Y ENERGIA SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO, pág. 198	
5.7.1.- Aminoácidos de cadena ramificada, pág. 201	
5.7.2.- Aminoácidos gluconeogénicos, pág. 205	
5.7.3.- Aminoácidos aromáticos, pág. 217	
5.7.4.- Aminoácidos básicos y azufrados, pág. 225	
5.7.5.- Sumas de aminoácidos: Esenciales, no esenciales y totales, pág. 228	
6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES, pág. 232	
7.- ABREVIATURAS, pág. 238	
8.- BIBLIOGRAFIA, pág. 239	

1.- OBJETO

A pesar de que en las últimas décadas, diversos factores han hecho reducir la frecuencia de enfermedades clásicas por deficiencia nutricional, la desnutrición tanto evidente como subclínica sigue siendo un gran problema sanitario y social especialmente en países en vías de desarrollo, aunque sin dejar de lado países desarrollados como Estados Unidos.

Es el motivo que ha llevado a este grupo de investigación a ahondar en el estudio de la malnutrición proteico-energética, y dado que el tema parece presentar enormes lagunas en lo que se refiere a los mecanismos mediante los cuales la nutrición puede influir en la homeostasia y función cerebral, es precisamente en dicho apartado donde se ha hecho hincapié en este trabajo.

La pregunta es cómo exactamente se pueden apreciar, identificar y prevenir las circunstancias bajo las cuales un suplemento nutricional alterado o un defecto en la metabolización periférica de aminoácidos causará alteraciones irreversibles o no en el desarrollo y función cerebral.

El aporte de proteínas, aminoácidos esenciales y energía en la dieta son factores que deciden por sí mismos el que se realice o no la síntesis proteica de forma adecuada en todo el organismo. Una dieta desequilibrada en aminoácidos y/o energía conduce inevitablemente a variaciones en la ingesta y peso corporal, así como a una serie de alteraciones metabólicas que se llegan a hacer visibles a nivel sanguíneo y en los tejidos corporales, como se ha comprobado en nuestro laboratorio (RODRIGUEZ, 1983). Si bien es cierto que el cerebro está entre los

tejidos corporales que pueden verse afectados por desequilibrios en la dieta, nuestra experimentación demuestra que es la parte más protegida del organismo. Aún así, existen limitaciones a dicha protección, PETERS y HARPER (1987) señalan al respecto, que modificaciones en el suplemento de aminoácidos en la dieta inducen cambios selectivos en los patrones de aminoácidos cerebrales.

SAID y HEGSTED (1970) han demostrado que dietas privadas de aminoácidos azufrados, isoleucina y treonina son las causantes de mayor pérdida de nitrógeno corporal, comparadas con dietas privadas de proteínas. Ello igualmente es comprobado por HEGER y FRYDRICH (1985), quienes establecen que la pérdida de nitrógeno corporal varía con el tipo de aminoácido omitido, alcanzando un máximo cuando la dieta carece de aminoácidos azufrados, seguida en orden decreciente por dietas carentes en valina, treonina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y tirosina, leucina y lisina. SAID Y HEGSTED (1970) también han observado que la deficiencia de aminoácidos esenciales en la dieta depende de los aminoácidos endógenos limitantes, que son precursores importantes de las proteínas sintetizadas de novo en condiciones deficitarias de las mismas.

El propósito de este trabajo es determinar, a intervalos crecientes de tiempo, las alteraciones de algunos parámetros bioquímicos del estado nutritivo inducidos por malnutrición proteica y proteico-energética, en ratas como animales de experimentación. Concretamente el proceso se lleva a cabo administrando dietas carentes de metionina y cisteína y de metionina, cisteína y con la mitad de energía, frente a una dieta control con el 10% de caseína mas DL-metionina. El estudio se lleva a cabo en cerebro y se relaciona con las variaciones de aminoácidos libres en dicho órgano, con lo que sucede en el plasma y glóbulos rojos.

La elección de la metionina como aminoácido esencial carente en las dietas experimentales radica en el papel que ejerce este aminoácido como iniciador de la síntesis proteica, al ser capaz de unirse, por un lado, al tRNA^f met (responsable de reconocer en cada molécula de mRNA el codon AUG para la iniciación de la síntesis de la cadena polipeptídica) y por otro lado, al tRNA^m met (dirige la inserción del aminoácido en posiciones internas) (ANDERSON y col., 1977). Además, incluso en condiciones de deficiencia, se necesita una gran proporción de metionina de la dieta como donador de grupos metilo, para la síntesis de ácidos nucleicos y de otros compuestos esenciales como colina, creatina

o metilhistidina, así como fuente de azufre para la formación de cisteína, taurina y sulfato (HEGER y FRYDRICH, 1985).

La cisteína, aunque no es esencial para los mamíferos adultos, es capaz de ahorrar hasta un 90% de los requerimientos dietarios de metionina (ROSE y WIXOM, 1955), es por lo que en este experimento también se ha prescindido de él en las dietas. El control sobre la producción y acumulación de cisteína durante el desarrollo de los tejidos es necesario por su toxicidad sobre el tejido nervioso en desarrollo.

El efecto ejercido por la reducción energética al 50% con privación de met+cis en la dieta también se estudia.

En definitiva, los datos obtenidos en este trabajo tienen como finalidad determinar posibles índices bioquímicos de malnutrición en sangre y cerebro, extrapolables en clínica humana, para el diagnóstico de estados iniciales y poco reconocibles de malnutrición proteica y proteico-energética.

2.- SITUACION BIBLIOGRAFICA

2.1.- INTRODUCCION

Diversos factores, entre los que se hallan el aumento de ingresos per cápita, la expansión de los programas de asistencia pública, y el enriquecimiento de los alimentos con vitaminas y minerales, han reducido la frecuencia de enfermedades clásicas por deficiencia nutricional. Sin embargo, la desnutrición sigue siendo un gran problema, sobre todo en los individuos de escasos recursos, personas de edad avanzada, alcohólicos, enfermos crónicos y poblaciones de hospitales.

Para lograr un enfoque racional de atención se debe llevar a cabo una evaluación del estado nutricional del individuo o grupo de ellos, calcular sus necesidades e instituir el tratamiento dietético adecuado. La simplicidad de las necesidades nutricionales, comparada con la complejidad de la composición corporal, es consecuencia de la gran capacidad de biosíntesis endógena (DANIEL RUDMAN, 1989).

La evaluación del estado nutricional se puede llevar a cabo mediante un examen dietario y evaluaciones bioquímicas, clínicas y antropométricas (YOUNG y col., 1990). Para el análisis bioquímico se toman muestras de sangre, tejidos y excretas (ROSLYN y col, 1980). Normalmente se eligen macro o microtécnicas lo mas simples y sensibles posibles, dependiendo del tipo de examen (LOWRY y BESSEY, 1945; LOWRY, 1952; SAUBERLICH y CANHAN, 1973; SAUBERLICH y col., 1973). Algunos de los procedimientos más tradicionales para análisis

en sangre y orina han sido modificados y completados por metodologías analíticas de alta sensibilidad (SAUBERLICH y col., 1972; LEVEILLE, 1972).

En la National Nutrition Survey (U.S.D.H.E.W., 1972), las determinaciones bioquímicas usadas en la evaluación del estado nutritivo incluyen hematocrito, hemoglobina, proteínas totales séricas, albúmina sérica, colesterol sérico, aminoácidos en plasma, vitamina A y carotenos plasmáticos, transketolasa, ácido ascórbico sérico, hierro total sérico, hierro ligado y ácido fólico sanguíneo. En la orina se analiza el contenido de albúmina, creatina, creatinina, glucosa, hidroxiprolina, yoduro, N-metil-nicotinamida, riboflabina, tiamina y nitrógeno ureico. Otros test bioquímicos incluyen la determinación de vitamina E y K.

La antropometría ha sido considerada uno de los mas importantes métodos de examen nutritivo porque proporciona medidas corporales, las cuales, son indicativas del nivel de grasa corporal (ROSLYN y col., 1980). En 1956, el Committee on Nutritional Anthropometry publicó una lista de medidas mínimas, consideradas esenciales, para indicar la grasa subcutánea y el conjunto esquelético (BROZEK, 1956), determinando talla, peso y pliegue cutáneo.

Así, se fabricaron tablas relacionando talla, peso y edad de niños. Ello, fué llevado a cabo por U.S.D.H.E.W. (1953), STATE UNIVERSITY OF IOWA (1943a,b) y WETZEL (1940). La METROPOLITAN INSURANCE COMPANY (1960) desarrolla tablas similares para adultos.

En niños en los que la malnutrición es evidente, los índices antropométricos que se estudian incluyen: talla, peso, longitud del brazo, medida del biceps y triceps y medida de la grasa. Todos éstos índices se utilizan como indicadores de la masa corporal, crecimiento y reservas proteicas y calóricas (ROSLYN y col., 1980).

En este último punto, la malnutrición debida a una inadecuada dieta proteica y energética, es en el que se centrará este trabajo.

2.2.- PROTEINAS Y ENERGIA

2.2.1.- Cosideraciones previas

Lo que caracteriza al individuo nutrido adecuadamente es una ingesta equilibrada en hidratos de carbono, grasas, protefñas, minerales, vitaminas y agua. Esta nutrición es imprescindible para que se desarrolle, crezca, conserve la vida, se reproduzca, resista las enfermedades y repare las lesiones (KRAUSE, 1971).

El metabolismo calórico trata de la transformación de la energfa de los alimentos en calor o trabajo. Por tanto, se genera energfa en el organismo a partir de los principios inmediatos, que serán metabolizados hasta agua y anhídrido carbónico. La célula animal sólo aprovecha la energfa química. La energfa calórica producida por los principios inmediatos es para los hidrocarbonados de 4 Kcal/g; para las grasas de 9 Kcal/g, y las protefñas ceden 4 Kcal/g. El etanol proporciona 7 kcal/g. Estos valores son el resultado de aplicar técnicas calorimétricas y serían algo mayores (4.1,9.4 y 5.6, respectivamente, HARPER,1962) calculándolos por bomba calorimétrica.

El metabolismo energético en el organismo animal se realiza de tal forma que la energfa liberada, al degradarse un principio inmediato o nutriente es igual a la que se utilizó en su síntesis (ley de conservación de la energfa). Los principales combustibles son la glucosa, los ácidos grasos libres y sólo en situaciones extremas de acidosis pueden utilizarse energéticamente los cuerpos cetónicos. La glucosa no se aprovecha inmediatamente, se almacena en forma de glucógeno. Cuando existen requerimientos energéticos se degrada el glucógeno y la glucosa es catabolizada para producir energfa, lo que puede ocurrir en todos los tejidos. Al producirse la degradación de una molécula de glucosa hasta pirúvico, la energfa que se libea se acumula en forma de dos moléculas de ATP. Pero además, al degradarse el pirúvico por el ciclo de Krebs (es el denominado metabolismo aeróbico), en cada vuelta del ciclo, se producen doce moléculas de ATP.

El cerebro se diferencia de otros tejidos perifericos en la glucolisis, ya que el transporte de glucosa es limitado en presencia o ausencia de insulina por

la hexokinasa (BERGER y col., 1975) a nivel de la BHE que tiene una constante de Michaelis para la glucosa baja, de 40 μmol (LUND-ANDERSON, 1979).

La concentración de glucosa normal en el cerebro es de 2-3 $\mu\text{mol/g}$ (3-4 mmol) que excede a las necesidades de la K_m de la hexokinasa. Por lo tanto, la glucólisis cerebral es sustrato independiente respecto a la insulina bajo c.n. Sin embargo, bajo condiciones patológicas la glucólisis cerebral puede no estar limitada por el transporte de glucosa-6-fosfato a través de la BHE.

El segundo gran combustible son las grasas que, hidrolizadas, liberan ácidos grasos libres (AGL). Estos AGL cumplen funciones estructurales y energéticas. El hígado capta AGL, que en un 80-90% son utilizados para la síntesis de otros lípidos y posteriormente de lipoproteínas. Otra pequeña parte, que aumenta en el ayuno y la cetosis, se transforma en cuerpos cetónicos, y una última parte se oxida y degrada desarrollando energía. También el músculo es capaz de captar y oxidar AGL hasta anhídrido carbónico liberando gran cantidad de energía (del 25-50% del anhídrido carbónico producido en el esfuerzo muscular puede proceder de la oxidación de los AGL). El corazón en el ayuno, extrae y capta AGL y obtiene energía de su oxidación. Esta función energética de los AGL es importante en situaciones de carencia de glucosa, o cuando aumentan excesivamente los requerimientos de glucosa (stress, descarga de catecolaminas, etc), situaciones en las que las necesidades energéticas son cubiertas por los AGL, reservándose la glucosa para el metabolismo activo del Sistema Nervioso.

El tercer combustible son los cuerpos cetónicos que, son catabolizados a anhídrido carbónico y agua, liberando energía. Los tejidos recurren a esta fuente de energía sólo en determinadas circunstancias de ayuno y cetosis. Incluso bajo estas condiciones extremas, el hígado y el cerebro se podría decir que no les utilizan o lo hacen en pequeña proporción. La utilización de los cuerpos cetónicos por el cerebro está limitada por su transporte a través de la BHE y por un enzima intracelular, acetoacetato-succinil-Co A-transferasa.

Por último, pueden ser fuentes energéticas las proteínas, que en individuos en situación metabólica normal se utilizan mayormente con fines estructurales (SCHÜLLER, 1980).

De la situación energética del organismo deriva la conducta alimentaria, puesta en juego a través de una serie de sensaciones específicas (DE PORTUGAL, 1980). Harris-Benedict entre otros autores se ocupan de dar una buena forma de medir con exactitud los requerimientos energéticos (DANIEL RUDMAN, 1989). Al reducir el total calórico aumenta mucho el metabolismo proteico y el balance se hace negativo en tanto no exista un mínimo proteico fisiológico.

Por otro lado, recordemos que la proteína no es un mero almacén de aminoácidos ya que estos tienen entre sí una cierta jerarquía funcional. En este sentido, la primera idea de jerarquía entre ellos procede de la diferenciación entre esenciales y no esenciales (VARELA, 1989). La división de los aminoácidos en esenciales y no esenciales fué originariamente realizada por Rose. Para ello se basó en si eran o no necesarios en la dieta para que se produjera un crecimiento óptimo en ratas (ROSE, 1938). El saber qué aminoácidos son esenciales para el hombre y cuáles no lo son es de suma importancia para el mantenimiento de una buena nutrición en adultos y para proporcionar un adecuado crecimiento y desarrollo en niños, particularmente cuando la ingesta proteica está limitada o se trata de casos patológicos.

La ausencia o deficiencia de un aminoácido indispensable en la dieta puede conducir a un balance de nitrógeno negativo, pérdida de peso, insuficiente crecimiento y desarrollo en niños, deficiencias subclínicas y síntomas clínicos, todo ello en función del aminoácido deficitario (STEWART y col., 1987).

En relación con los aminoácidos esenciales, se sabe hoy que la capacidad endógena para fabricarlos no es del mismo orden para todos ellos. Por ejemplo, el hombre parece carecer por completo de la posibilidad sintetizadora de algunos, como es el caso de la treonina y de la lisina. Por ello se habla en estos casos de que estos aminoácidos tienen una esencialidad del 100%. Para el resto de los aminoácidos esenciales esta proporción es bastante menor, lo que quiere decir que somos capaces de fabricarlos pero no en cantidad suficiente para las distintas funciones que tienen asignadas. En opinión del autor, el concepto de porcentaje de esencialidad tiene un mejor significado que el convencional de todo o nada, y explica entre otras cosas, por ejemplo, porqué algunos aminoácidos como la arginina y la histidina son esenciales para el niño y no para el adulto (VARELA, 1989).

JACKSON en 1983 evaluó la esencialidad de aminoácidos según sus componentes estructurales y sugirió clasificarlos en cuatro categorías basándose en la capacidad o incapacidad del organismo para sintetizar todos o parte de ellos. En la primera categoría se encuentran lisina y treonina, que no pueden ser sintetizados en el organismo por no producirse la transaminación. En la segunda categoría se incluyen histidina, aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), metionina, fenilalanina y triptófano, que no pueden ser sintetizados en humanos pero son fácilmente sintetizables a partir de sus cetoácidos o análogos hidroxiácidos por transaminación. La tercera categoría agrupa glicina y serina, los cuales pueden ser sintetizados fácilmente, pero la proporción de transaminación es baja. Su síntesis puede llegar a ser inadecuada si la demanda metabólica para cada aminoácido aumenta. La cuarta categoría incluye los aminoácidos que fácilmente se pueden sintetizar en el organismo por la facilidad de transaminación. Tenemos en este grupo, alanina, glutamato y aspartato.

Según STEWART y col. (1987), esta clasificación de los aminoácidos esenciales ofrece datos importantes sobre la bioquímica y metabolismo de los mismos. Sin embargo, es necesario aplicar ciertas modificaciones para facilitar la tarea al nutriólogo y/o facultativo. Así, el autor realiza la siguiente agrupación:

A/ Aminoácidos totalmente indispensables: lisina y treonina. Estos aminoácidos han de ser incluidos en la dieta.

B/ Aminoácidos indispensables: histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y valina. Su cetoácido o su análogo hidroxiácido puede sustituir al aminoácido en la dieta. Su deficiencia produce un rápido desarrollo de un balance de nitrógeno negativo.

C/ Aminoácidos indispensables condicionalmente: tirosina, cisteína y, posiblemente, ornitina y citrulina. Estos aminoácidos, pueden reducir el requerimiento nutricional de algunos indispensables. Pueden llegar a ser indispensables cuando en la dieta no están sus precursores.

D/ Aminoácidos indispensables adquiridos: Pueden llegar a ser indispensables en estados de desórdenes metabólicos o inmadurez o en stress severo. Estas situaciones incluyen: 1/inmadurez de procesos sintéticos en niños prematuros o

neonatos (ej.: cisteína y tirosina), 2/desórdenes genéticos de la función o actividad enzimática (ej.: arginina, citrulina, cisteína y tirosina), 3/ enfermedades adquiridas, tales como fallo hepático crónico y síndrome de Reye (ej.: cisteína, tirosina, arginina y citrulina), y 4/ situación de una duradera ingesta de aminoácidos, tal como nutrición intravenosa (ej.: arginina y, posiblemente, citrulina).

E/ Aminoácidos no indispensables: alanina, glutamato y aspartato.

Es sabido que la taurina es indispensable para niños y adultos sometidos durante largo tiempo a una nutrición parenteral total, así como para niños prematuros y de bajo peso al nacer.

Esta clasificación, puede no resultar válida en casos clínicos como enfermos crónicos, niños prematuros, etc.

La rata tiene los mismos aminoácidos indispensables que el hombre más la histidina y la arginina (D'MELLO y LEWIS, 1978).

Las proteínas, ya sean de procedencia exógena o endógena, tienen como misión primordial la síntesis y reparación tisular, más que la producción energética (SCHÜLLER, 1980), como ya hemos comentado. A esta consideración nos llevan razones fisiológicas e incluso- en otro orden de cosas- económicas, dado el menor costo de las calorías procedentes de las grasas o de los carbohidratos en relación con las procedentes de la proteína (VARELA, 1989).

Para que en nuestro organismo se forme una determinada proteína es necesario que estén en los lugares corporales de síntesis proteica, a disposición del ribosoma, todos los aminoácidos que han de secuenciarse, sean esenciales o no (BLOCK and MITCHELL, 1946; BESSMAN, 1972; BESSMAN, 1979; VARELA, 1989) ya que una deficiencia intracelular de alguno de los mismos hace que quede limitada la síntesis proteica. Basándose en estos conceptos Bessman propone que el desarrollo del cerebro no es perfecto tras una deficiencia de aminoácidos, llegando incluso a producirse un retardo mental (STEWART y col., 1987).

La síntesis proteica es alta en recién nacidos, disminuye con el

crecimiento y desarrollo progresivos. Esta disminución es paralela a la que se produce en el metabolismo energético corporal (YOUNG y col., 1975).

La síntesis proteica es dos veces mas alta en prematuros que en niños preescolares y aproximadamente tres ó cuatro veces superior que en adultos. La degradación proteica es también mayor en niños que en adultos aunque es menor la diferencia. A todas las edades, la síntesis y la degradación proteica son considerablemente mayores que la ingesta proteica dietaria recomendada. Esto lleva a pensar que hay una gran reutilización dentro del cuerpo de aminoácidos que se han liberado durante la degradación proteica. Este reciclaje de aminoácidos y la proporción de síntesis y degradación de proteínas corporales varían en respuesta a varios estímulos, incluyendo alteraciones en el nivel y adecuación de proteínas y aminoácidos ingeridos (YOUNG y col., 1985a; YOUNG y col., 1985b).

Algunos investigadores demuestran que ratas alimentadas con dietas que contienen sólo aminoácidos esenciales empeoran la ganancia de peso comparadas con ratas alimentadas con mezclas de aminoácidos esenciales y no esenciales (PENNISI y col., 1976; HARPER, 1983). Cuando el nitrógeno no esencial es adicionado a una mezcla de aminoácidos esenciales hay un incremento en la ganancia de peso en ratas y un mantenimiento del balance de nitrógeno en humanos; esto puede reflejar una incapacidad para sintetizar todos los aminoácidos dispensables en la proporción y con la eficacia necesaria para conseguir una síntesis proteica óptima (STEWART y col., 1987).

Dada la importancia de las proteínas para el mantenimiento de la vida, se ha visto la necesidad de establecer unas recomendaciones. En este sentido, se produjo un gran avance en 1946 con BLOCK y MITCHELL, quienes demostraron la relación entre la calidad de la proteína de la dieta y el contenido en aminoácidos esenciales.

Es en el periodo de 1950 a 1960 cuando se resalta la importancia de los aminoácidos esenciales para explicar la necesidad de la presencia de proteínas en la dieta; ello se lleva a cabo mediante una serie de medidas cuantitativas sobre los requerimientos humanos de aminoácidos individuales. Los requerimientos del hombre en proteínas, aminoácidos y energía, han sido revisados frecuentemente y las recomendaciones han sido publicadas en 1985 por un comité de expertos de la

FAO/WHO/UNU. También este comité ha dado las técnicas necesarias para la estimación de dichos requerimientos y define las necesidades en proteínas y aminoácidos esenciales de un individuo como el nivel más bajo de ingesta que equilibrará las pérdidas de nitrógeno y aminoácidos (vía catabolismo oxidativo) del organismo, sin cambios en el turnover de proteínas y durante un estado de equilibrio energético y una actividad física moderada. En niños en edad de crecimiento y/o desarrollo y en mujeres en periodo de lactación, los requerimientos sólo incluyen la cantidad de proteínas asociadas al depósito de estas a los tejidos y la secreción de ellas en la leche. Pero hemos de tener en cuenta, que los requerimientos reales de aminoácidos esenciales están por encima de los que dicta la FAO/WHO/UNU. Concretamente, los aminoácidos de cadena ramificada junto con la treonina y lisina forman las dos terceras partes de los requerimientos de aminoácidos esenciales (YOUNG y BIER, 1987; MILLWARD Y RIVERS, 1988; PALMER, 1990).

Los requerimientos y suministros de proteínas en la dieta dependen del valor biológico (VB) de cada una (National Academy of Sciences, 1978) y del ingreso energético. Así se sabe que la cantidad de proteína "utilizable" o "completa" de la dieta es función de la cantidad y calidad de proteína (FAO/WHO, 1973) y las deficiencias en la proteína y/o energía dietaria pueden reducir el crecimiento y la retención de nitrógeno (CALLOWAY, 1981). Un gran número de investigadores han observado que aumentando la calidad de la proteína de una dieta para ratas lactantes aumenta el peso de su cría (JANSEN y col., 1986). JASEN y MONTE (1977) demuestran que la ganancia de peso aumenta en crías de ratas cuando la calidad de la proteína de la dieta materna era mejorada e incluso cuando la ingesta alimentaria fué limitada con esta misma calidad proteica.

Aparecen casos en los que los aminoácidos esenciales pueden resultar "ahorrados" utilizando otros aminoácidos químicamente relacionados. Por ejemplo, cistina y tirosina ejercen un efecto de "ahorro", de manera que el 90% de los requerimientos de metionina y el 70% de los de fenilalanina pueden cubrirse administrando cistina y tirosina, respectivamente (DANIEL RUDMAN, 1989).

Las necesidades dietarias de proteínas y aminoácidos son también afectadas por el turnover de proteínas corporales y la actividad de vías asociadas

con el catabolismo de aminoácidos. Estos procesos metabólicos se ven influidos por la calidad y cantidad de proteína dietaria.

Concluyendo, PALMER (1990), basándose en las estimaciones de la FAO/WHO/UNU en 1985, recomienda 0.8 gramos de proteína por kilo de peso corporal y por día para adultos, ya sea hombre o mujer; de 2300 a 2900 kilocalorías por día para hombres adultos y de 1900 a 2200 kilocalorías por día para la mujer también adulta.

2.2.2.- Relación entre calidad y cantidad de la proteína dietaria, ingesta calórica y utilización de nitrógeno

La importancia de la relación proteínas/calorías en la dieta, ha sido comprobada en numerosos estudios de nutrición animal (MORRISON y NARAYANA RAO, 1967). Así HILL y DANSKY en 1954, trabajando con pollos, observan que el consumo de alimentos y los niveles de grasa en la carcasa están determinados por el consumo de energía de la dieta. Establecen fácilmente una clara relación entre los requerimientos de proteína y energía. Cuando los requerimientos energéticos se cubren con calorías que no proceden de proteínas, una parte sustancial de los aminoácidos ingeridos se utilizan para la síntesis proteica. Por el contrario, si la ingestión calórica es deficiente, algunos aminoácidos se usan para el metabolismo oxidativo y la gluconeogénesis. En esas circunstancias, el requerimiento diario de proteínas resulta inversamente proporcional al ingreso energético ("efecto de ahorro de las proteínas por las calorías no proteicas"). Por eso, la desnutrición energética hace que la persona sea mas vulnerable a la privación de proteínas, interacción que explica la alta frecuencia de estados de desnutrición mixta, proteico-calórica.

El efecto de ahorro de proteína por las calorías no proteicas depende del origen de las mismas. Los hidratos de carbono, ahorran proteínas, pero si faltan, los lípidos no actúan así. El ahorro de proteína es máximo cuando las calorías no proteicas incluyen de 100 a 150 gramos de hidrocarbonados al día, los restantes pueden darse en forma de lípidos, hidratos de carbono o una mezcla de ambos (DANIEL RUDMAN, 1989).

En general, hay tendencia a aumentar la ingesta de energía mas allá

de los requerimientos para prevenir la pérdida de peso en dietas bajas en proteína. Ello hace variar el balance de nitrógeno, al haber mayor retención de nitrógeno con un exceso de calorías (BLOCK Y MITCHELL, 1946). Esto ha sido demostrado por INOUE y col. (1973), quienes vieron que los requerimientos de proteínas para el hombre joven se podían alterar significativamente al variar su ingesta energética.

Los individuos sanos tienen, en general, sus necesidades de nitrógeno cubiertas, ya que lo ingieren en su dieta también en cantidades mayores a las recomendaciones, incluyendo en ello los aminoácidos esenciales (KIES, 1972; SWENDSEID y KOPPLE, 1975).

En 1957, YOSHIDA, HARPER y ELVEHJEN, refieren la importancia de la relación proteínas/energía a que es un factor determinante de la utilización de energía y nitrógeno en el crecimiento de ratas. Es en 1962 cuando WAGLE, MARFATIA y SREENIVASAN, ponen de manifiesto que al aumentar el contenido de proteínas o energía de la dieta se produce un aumento en la retención de nitrógeno, así como en los lípidos de la carcasa, hígado y plasma. La relación entre la energía de la dieta y la calidad de las proteínas se indica en los trabajos de LOWREY, POND, BARNES, KROOK Y LOOSLI en 1962. En 1961 MILLER y PAYNE nos hacen ver cómo la utilización neta de la proteína (NPU) disminuye linealmente al ir aumentando las calorías debidas a proteínas de la dieta, siendo este efecto más o menos marcado según el tipo de proteína. Cuando la proteína tiene un NPU de valor cero, no hay retención de nitrógeno. También sugieren que todas las proteínas pueden proporcionar energía, pero cuando la dieta presenta un exceso de las mismas, aparece un valor máximo de NPU que depende del tipo de aminoácidos que componen la proteína, disminuyéndose proporcionalmente la retención de nitrógeno. Ello nos lleva a pensar en la toxicidad que presenta una dieta excesivamente rica en proteínas.

Numerosos trabajos demuestran cómo el organismo es capaz de proporcionarse unas reservas proteicas suficientemente lábiles cuando la ingesta de calorías es inadecuada (HIRSCHFELD, 1890; MUNRO, 1951; MORRISON, 1964). Pero aún en condiciones de una restricción calórica severa, parte de las proteínas dietarias son utilizadas para el anabolismo.

Existen situaciones que pueden aumentar los requerimientos de

energía y proteínas pero en distinta proporción. Así, durante el embarazo los requerimientos proteicos pueden aumentar hasta un 27% mientras que los energéticos aumentan un 25%.

Se puede decir, entonces, que la relación proteínas/calorías de la dieta ejerce una clara influencia sobre la ganancia de peso, composición corporal y utilización de nitrógeno (MORRISON y NARAYANA RAO, 1967).

La relación entre el nivel dietario de aminoácidos y el balance de nitrógeno parece justificar la forma sigmoidal de la curva dosis-respuesta experimentada por HEGSTED (1964). Un tipo de curva similar a la de Hegsted es obtenida por YOSHIDA y ASHIDA (1969), que estudian la relación entre el nivel de aminoácidos limitantes en la dieta y los cambios en el peso corporal de ratas en crecimiento. Han sido propuestos varios modelos de curvas dosis-respuesta con una interpretación matemática, sin embargo, todos tienen algún inconveniente. El modelo lineal de Hegsted no considera la dosis óptima (MORRIS, 1983). Esto fué confirmado por HEGGER y FRYDRYCH (1985), quienes además afirman que la pérdida de nitrógeno observada en animales alimentados con una dieta exenta de algún aminoácido esencial varía con el tipo de aminoácido omitido. Datos similares proceden de otros autores (SAYD y HEGSTED, 1970; BENDER, 1965), los cuales encuentran que ratas alimentadas con dietas libres en aminoácidos azufrados (metionina, cistina, cisteína y taurina), treonina e isoleucina son las que tienen el balance de nitrógeno más bajo. SAID y HEGSTED (1970) observan que dietas carentes de treonina, isoleucina y aminoácidos azufrados causan la misma pérdida de nitrógeno corporal que una dieta libre de proteínas. A esa dieta carencial BENDER (1965) añade la deficiencia en valina.

Así, se llega a pensar que la pérdida de nitrógeno debida a la deficiencia de varios aminoácidos depende de la limitación de aminoácidos endógenos, los cuales son precursores de proteínas bajo esas condiciones carenciales. Son YOSHIDA y MORITOKI (1974) y YOKOGOSHI y YOSHIDA (1976) quienes demuestran que la metionina y la treonina son los dos aminoácidos de origen endógeno más importantes y su adición a una dieta carente de proteínas tiene un efecto ahorrador de nitrógeno.

El seguimiento histórico sobre la acción ahorradora de nitrógeno de

la metionina y treonina se detalla a continuación. WILLMAN y col. (1945) indican que ratas alimentadas con dietas que contienen 3.5% de proteína de huevo excretan menos nitrógeno que ratas alimentadas con dietas pobres en proteínas. BRUSH y col. (1947) más tarde demuestran que la acción ahorradora de nitrógeno de la proteína del huevo era principalmente debida a su contenido en metionina. ALLISON y col. (1947) aportan observaciones similares en perros. Señalan que la adición de metionina a una dieta libre de proteínas o a dietas que contienen caseína o huevo reduce la excreción de nitrógeno en perros adultos y la excreción de nitrógeno permanece más baja que los controles durante varios días después de que los aminoácidos han sido eliminados de la dieta. Anteriormente, en 1946, estos mismos autores (ALLISON y col., 1946) sugieren que la excreción de nitrógeno en animales alimentados con una dieta libre de proteínas depende de sus reservas de proteínas lábiles y es más baja cuando esas reservas están agotadas. Investigaciones realizadas en 1957 por STEKOL y col. y en 1963 por EDWARDS también aportan conocimientos al respecto.

LUBASZEWSKCA y col. al año siguiente (1973), indican que el suplemento de metionina a una dieta libre de proteínas reduce el nitrógeno urinario sólo en animales que no tienen agotadas sus reservas de proteínas corporales lábiles y éste efecto le refiere a la resíntesis de esas reservas.

YOSHIDA y MORITOKI, ya en 1974, encuentran que el suplemento de metionina y treonina a una dieta libre de proteínas reduce marcadamente la pérdida de peso corporal y la excrección urinaria de nitrógeno.

HORIE y ASHIDA (1973) demuestran un aumento inicial del balance de nitrógeno y una reducción del nitrógeno excretado en ratas alimentadas primero con una dieta con un nivel adecuado de proteínas y después con una dieta baja en proteínas, éstas ratas las comparaba con unas controles que tomaban una dieta con nivel de proteínas adecuado. Los resultados los explicaba como una adaptación enzimática a un nivel bajo de proteínas y la reducción de la excrección de nitrógeno podía atribuirse a un descenso en la producción de urea hepática. Esta interpretación no la dan como válida YOSHIDA y col., es decir, no piensan que la disminución de la excrección de nitrógeno urinario fuera debida a un descenso del nivel de enzimas hepáticas del catabolismo de aminoácidos. Este autor considera mas tarde (YOKOGOSHI y col., 1974) que el efecto de metionina y treonina

adicionadas a una dieta libre en proteínas sobre el catabolismo de las proteínas del hígado y del músculo de ratas podía hacerlo disminuir.

AGUILAR y col. (1972, 1974) observan que la metionina es más oxidada que otros aminoácidos esenciales. Por ello, YOKOGOSHI y YOSHIDA (1976) determina que la reducción de la excreción de nitrógeno causada por el suplemento de metionina y treonina puede ser debida a que favorecen ambos la reutilización de otros aminoácidos endógenos, si la metionina y la treonina son los aminoácidos más limitantes. Un aumento en la cantidad de metionina y treonina suplementadas en la dieta no muestran un beneficio adicional sobre la pérdida de peso corporal y la excreción de nitrógeno.

Los requerimientos de aminoácidos azufrados en una dieta con un 5% de aminoácidos son de 0.14% según ASHIDA y YOSHIDA (1972). Algunos laboratorios observan que la deficiencia de cada aminoácido esencial realiza su efecto particular sobre el balance de nitrógeno. Así la deficiencia de la metionina o la treonina causan el balance de nitrógeno más severo, y la deficiencia de lisina o histidina muestran un pequeño efecto sobre el balance de nitrógeno. El efecto de la deficiencia de otros aminoácidos esenciales sería intermedio entre las dos situaciones extremas anteriores. De estos resultados deducen que cuando las ratas son alimentadas con una dieta libre de proteínas, deficiente en todos los aminoácidos esenciales, la suplementación de una pequeña cantidad de metionina y treonina puede aumentar la importancia de un grupo de aminoácidos limitantes secundarios (probablemente isoleucina, valina y triptófano) y puede aumentar la reutilización de aminoácidos formados endógenamente.

Más recientemente, en el experimento llevado a cabo por HEGER y FRYDRYCH (1985), la pérdida de nitrógeno corporal con una dieta libre de aminoácidos azufrados fué mucho mayor que con dietas carentes en cualquier otro aminoácido, siendo de relevancia las dietas deficientes en valina, isoleucina o treonina. Establecen que la pérdida de nitrógeno corporal es máxima cuando la dieta carece de aminoácidos azufrados, seguida en orden decreciente por dietas carentes en valina, treonina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y tirosina, leucina y lisina. Estas ideas concuerdan con las de BENDER, SAID y HEGSTED. Las menores pérdidas de nitrógeno se encuentran con dietas carentes de histidina o lisina (HEGER y FRYDRYCH, 1985). Son muchos los autores que acreditan los

bajos requerimientos de lisina para el mantenimiento del organismo (BURROUGHS y col., 1940; BENDITT y col., 1950; SMITH y JOHNSON, 1967). Animales alimentados con dietas carentes en lisina ponen en marcha un cierto mecanismo homeostático que opera para prevenir la degradación de lisina y ayuda al organismo a adaptarse (YAMASHITA y ASHIDA, 1969). Se tiene menos información, en comparación con la lisina, sobre el efecto de dietas carentes en histidina sobre el crecimiento y balance de nitrógeno. OUSTERHOUT (1960) y YOSHIDA y ASHIDA (1969) demuestran que la pérdida de peso de animales alimentados con dietas carentes en histidina es muy baja comparada con lo que sucede si la carencia es de lisina. Resultados similares obtienen ASHIDA y YOSHIDA (1975) en sus estudios sobre balance de nitrógeno. Es la histidina el aminoácido esencial más económico, y el que menor nivel de oxidación presenta (AGUILAR y col., 1972). La lisina, junto con la treonina, se consideran aminoácidos limitantes por encontrarse en pequeña proporción en los alimentos (CIESLAK y BENEENGA, 1986).

La experiencia (YOKOGOSHI y YOSHIDA, 1976), también demuestra que en la acción ahorradora de nitrógeno por la metionina y treonina influye el sexo, es decir, las hormonas sexuales están relacionadas con la inducción de grasa hepática y la retención de nitrógeno de ratas alimentadas con dietas libres de proteínas suplementadas de metionina sólo o con treonina y metionina. Las ratas hembras reducen más la excreción de nitrógeno que los machos.

HOSOTANI y YOSHIDA (1974) aportan que la acumulación de grasa hepática en las condiciones dietarias citadas con anterioridad es mayor en ratas hembras que en machos. FABER (1967), YAMASAKI y NATORI (1972) también aportan conocimientos al respecto. La concentración de metionina en el hígado y el plasma fué más alta en ratas machos que en hembras (FABER, 1967).

Pero si la ingesta proteica hace variar el balance de nitrógeno, mayor influencia sobre él se ha visto que tiene la ingesta energética (CALLOWAY, 1975; CHEREL y LE MAHO, 1991), como se podrá ver más tarde demostrado en el apartado correspondiente a la discusión de este trabajo.

2.3.- METABOLISMO CEREBRAL

2.3.1.- Metabolismo cerebral de nutrientes

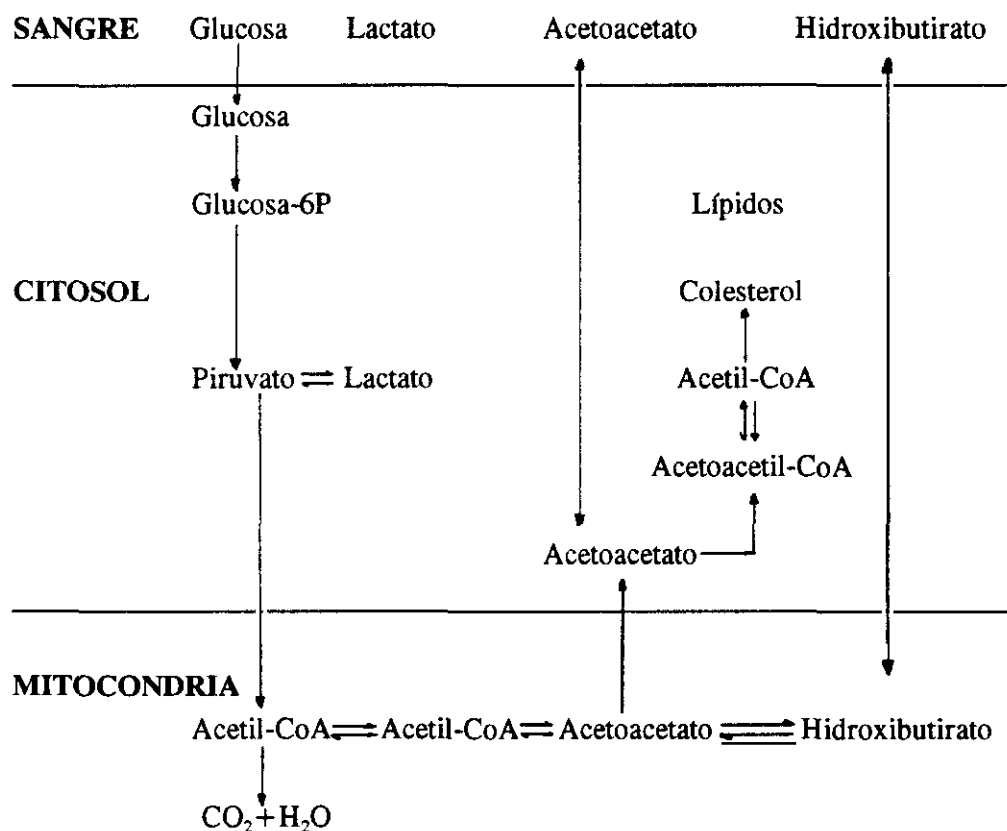
La alta actividad metabólica del cerebro hace que este sea muy sensible a las fluctuaciones de nutrientes y reservas corporales. El cerebro constituye el 2% del peso corporal de un adulto. Los altos requerimientos energéticos cerebrales, 17 Kcal/100 g de cerebro/min, no se explican demasiado bien. La síntesis proteica (similar a la del músculo), es un proceso que requiere de mucha energía (WAELSCH y LAJTHA, 1961). Además, la transmisión del impulso nervioso consume constantemente energía y puede que sea el proceso en el que mayor cantidad se utiliza (BACHELARD y col., 1962; RANG y RITCHIE, 1968).

Así, el principal papel de los sustratos empleados por el SNC es proporcionar, a través de su oxidación, energía para el mantenimiento de la función cerebral. Además, ciertos sustratos pueden actuar como precursores de procesos biosintéticos (Ej.: síntesis de lípidos mielínicos durante el desarrollo a partir de glucosa o cuerpos cetónicos) o síntesis de proteínas (aminoácidos). Aparte de su papel como combustibles respiratorios, los sustratos cerebrales pueden actuar también como señales para el control del apetito o afectar a la neurotransmisión (WILLIAMSON, 1987).

En el desarrollo cerebral, la glucosa es la principal fuente de energía, de modo que los requerimientos energéticos del cerebro casi sólo se surten de la degradación aerobia de glucosa (SOKOLOFF y col., 1977).

Sólo el 7% aproximadamente de la glucosa captada por el cerebro se degrada a ácido láctico y alrededor del 30%, se oxida vía ciclo del ácido cítrico. El resto de la glucosa, el 60%, es convertida en aminoácidos vía alfa-cetoácidos (SIEBERT y col., 1986).

Como el cerebro no almacena energía, depende del constante suministro de glucosa, la cual ha de atravesar la BHE mediante un sistema de transporte facilitado que incluye un transportador específico de hexosas (OLDENDORF, 1971).



* METABOLISMO DE SUSTRATOS CEREBRALES

Durante un periodo prolongado de privación de glucosa, las mitocondrias neuronales y gliales utilizan cuerpos cetónicos como fuente principal de energía. Sin embargo, ésta adaptación a los cuerpos cetónicos no es completa y el cerebro sigue teniendo unos requerimientos de glucosa que, probablemente, son proporcionados a partir de ácido láctico vía hepática (SOKOLOFF, 1981). En situaciones especiales, parece que el lactato puede reemplazar a los cuerpos cetónicos (WILLIAMSON, 1987).

El cerebro fetal, al igual que el del adulto, utiliza la glucosa como principal fuente de energía (JOST y PICHON, 1970). Cuando el parto interrumpe esta transferencia, las reservas de glucógeno acumuladas durante la última época de vida fetal son agotadas rápidamente (JOST, 1966). El recién nacido toma la energía de la beta-oxidación de las grasas que toma en la leche, y el cerebro

aprovecha primeramente los cuerpos cetónicos como combustibles durante el final de la lactación (DRAHOTA y col., 1964; HAWKINS y col., 1971; LOCKWOOD y BAILEY, 1971; PAGE y col., 1971; BOOTH y col., 1980). Los niveles normales de glucosa sanguínea son mantenidos por la gluconeogénesis a partir del piruvato, lactato, glicerol y algunos aminoácidos (GIRARD, 1986). Así, tras el periodo final de lactación, el animal joven desarrolla los patrones alimentarios del adulto, de manera que la glucosa, de nuevo, llega a tener una gran importancia como fuente de energía. Al mismo tiempo, las enzimas cetogénicas hepáticas (LOCKWOOD y BAILEY, 1971) utilizan los cuerpos cetónicos (LOCKWOOD y BAILEY, 1971; PAGE y col., 1971; BOOTH y col., 1980) y la cantidad de estos que pasan a través de la BHE disminuye (MOORE y col., 1976). Así como se observan cambios con respecto a la captura de cuerpos cetónicos, también se detectan cambios en la cinética del transporte de glucosa (CREMER y col., 1979). Se cree que la BHE poco desarrollada tiene una función protectora en animales jóvenes ya que así la captura de glucosa por el cerebro depende menos del transporte facilitado saturable y por tanto durante el periodo de hipoxia el cerebro puede anaeróbicamente proporcionarse ATP vía glucólisis y así proveerse de los requerimientos energéticos (SIEBERT y col., 1986).

La disponibilidad de los cuerpos cetónicos en la circulación depende de su síntesis por el hígado, la cual es regulada a dos niveles: Flujo de ácidos grasos de cadena larga al hígado y su destino dentro del hígado (McGARRY y FOSTER, 1980; ROBINSON y WILLIAMSON, 1980). Una disminución de la glucosa sanguínea bajará el nivel de insulina plasmática, lo que conduce a un aumento de la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo. Si el almacén de glucógeno hepático está vacío, se produce la entrada de ácidos grasos que serán oxidados y formarán cuerpos cetónicos. Además, aumenta la producción de cuerpos cetónicos en la sangre cuando la glucosa debe ser ahorrada, por ejemplo, en inanición, en dietas altas en grasas o proteínas y bajas en carbohidratos, ayuno, post-ejercicio, última época del embarazo, neonatos, diabetes no tratadas... y el uso por el cerebro de los mismos es confirmado en algunos de esos casos (OWEN y col., 1967; MOORE Y COL., 1976; WILLIAMSON, 1987).

MILLER y col. (1973), CREMER y HEATH (1974) y RUDERMAN y col. (1974) fueron los primeros en afirmar que la concentración cerebral de cuerpos cetónicos es muy baja aunque su concentración en plasma sea alta. Por

tanto, la utilización de cuerpos cetónicos por el cerebro en estado de cetonemia es limitada por su transporte a través de la BHE.

El metabolismo de cuerpos cetónicos en el cerebro es similar al de los tejidos periféricos y se encuentra limitado por una enzima intracelular, acetoacetato-succinil Co A-transferasa (SOKOLOFF, 1973). La actividad de las enzimas iniciadoras del metabolismo de los cuerpos cetónicos en el hombre se mantiene constante a lo largo de la vida (PAGE y WILLIAMSON, 1971; PATEL y col., 1975a). En el cerebro de rata, la actividad enzimática aumenta mucho (300%) en el periodo neonatal, cuando la rata recibe una dieta rica en grasas a través de la leche materna y disminuye de nuevo después del destete (PAGE y col., 1971), igual que en el hombre como ya se ha mencionado.

Los cuerpos cetónicos, además, son los sustratos más importantes de la circulación que actúan como señales en el cerebro para regular el metabolismo corporal total, la ingesta dietaria o la conducta (WILLIAMSON, 1987).

Los estudios de HAWKINS y BIEBUYEK (1979) han demostrado una distribución regional en el cerebro para el metabolismo de los cuerpos cetónicos. Las áreas corticales tienen una mayor preferencia para la utilización de cuerpos cetónicos que centros más primitivos como los ganglios basales.

En cuanto al lactato, según ZIMMER y LANG (1975), en animales adultos sanos la cantidad que llega al músculo esquelético es mayor que la que llega al cerebro. En condiciones normales, el transporte de lactato a través de la BHE es bajo, y se piensa que pueda ser debido a una mecanismo protector del cerebro para no caer en una hiperlactil acidemia fisiológica.

Los aminoácidos juegan un papel clave a nivel cerebral, son el sustrato para la síntesis proteica y de neurotransmisores y, en pequeña cantidad, proporcionan energía. Menos de un 10% de la energía total utilizada por el cerebro procede de la oxidación de aminoácidos (SOKOLOFF Y COL., 1977).

Los aminoácidos son capturados por el cerebro mediante un mecanismo de transporte mediado por un transportador limitante (PADRIDGE, 1977a). Generalmente, la concentración de aminoácidos en el cerebro se aproxima

a la del plasma, excepto para la glutamina, taurina, glutamato, aspartato, N-acetil-aspartato y glicina, que son más altas en el cerebro (GLANVILLE y ANDERSON, 1985; LAJTHA y col., 1981). El grado de desarrollo cerebral influye sobre su concentración de aminoácidos. Así, la prolina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina y triptófano, son más altos en el cerebro inmaduro, y su concentración disminuye alcanzando las concentraciones del adulto después del destete (AGRAWAL y col., 1966). La alta concentración de éstos aminoácidos hace que exista una difusión a través de la BHE inmadura. Hay evidencia de que, al menos, para los aminoácidos neutros de cadena larga (AANL: tyr, trp, phe, val, leu, ileu) hay un transporte de aminoácidos a través de la BHE, aún incompleta, que es facilitado por un sistema de transporte activo (BAÑOS y col., 1978).

Los lípidos son captados por el cerebro lentamente mediante difusión y ello es suficiente para proporcionar los ácidos grasos esenciales requeridos por éste órgano. Sin embargo, la biosíntesis local puede ser la vía mas importante para el suplemento de ácidos grasos cerebrales (BOURRE y col., 1978). Es decir, el cerebro es capaz de sintetizar ácidos grasos y de elongar y desaturar los ácidos grasos esenciales. Durante el periodo de desarrollo temprano, cuando hay gran demanda de ácidos grasos polienólicos de cadena larga, el cerebro tiene una actividad enzimática alta que disminuye con el tiempo y de manera inversa al hígado (NAUGHTON, 1981). El alto cociente respiratorio del cerebro hace que muy poca grasa sea catabolizada para proporcionar energía bajo condiciones normales (SOKOLOFF y col., 1977).

Se tiene poca información sobre los mecanismos de captura y factores que afectan al contenido de vitaminas y minerales en el cerebro. El transporte de vitaminas se cree que se realiza mediante un sistema de transporte específico insaturado (ORDONEZ, 1977), lo cual hace pensar que el nivel de vitaminas en el plasma y su aumento en la dieta, influye en su biodisponibilidad.

Además, es fácil suponer que el metabolismo cerebral, incluso bajo condiciones adecuadas de nutrición, puede ser influido por variaciones en la calidad y cantidad de alimento consumido. Ello también afecta a la actividad neuronal. Para mayor información sobre el tema se puede recurrir a las publicaciones de LI y ANDERSON, 1983 y LEPROHON-GREENWOOD y ANDERSON, 1986.

2.3.2.- Aminoácidos en el cerebro

Los aminoácidos juegan importantes funciones en el cerebro. En primer lugar, los aminoácidos son precursores de las proteínas estructurales que son esenciales para el crecimiento y en segundo lugar producen energía aunque en baja proporción, es decir, la oxidación de los aminoácidos proporciona menos del 10% de la energía total que utiliza el cerebro (SOKOLOFF y col., 1977). Pero además, tienen una gran variedad de funciones que sirven para el mantenimiento de la homeostasia corporal normal, el crecimiento y el desarrollo. Los aminoácidos son precursores de enzimas, hormonas peptídicas y transmisores peptídicos. Así, el aminoácido glicina es un precursor de porfirinas y purinas. La taurina y la glicina son precursores en la síntesis de ácidos biliares. La tirosina es un precursor de la tiroxina y melanina. La mayoría de los aminoácidos sirven como precursores en la gluconeogénesis, excepto la leucina. Muchos aminoácidos son neurotransmisores y otros son precursores de neurotransmisores:

a.- Aminoácidos neuroactivos: Gamma-aminobutirato, glutamato, aspartato, taurina, β -alanina, ácido cisteico, ácido cisteín-sulfúrico, prolina, glicina, cistationina y el ácido homocisteico.

b.-

<u>Precusores</u>	<u>Neurotransmisor/es</u>
phe, tyr	dopamina, norepinefrina
trip	serotonina
glu	GABA
met, cis	ácido cisteín sulfínico, taurina
his	histamina, carnosina
ser	glicina

Todas estas funciones han sido revisadas, continuadas y acumuladas por De FEUDIS y MANDEL (1981). Estos datos incluyen la presencia en la sinapsis, síntesis en la neurona, mecanismos para la inactivación en la sinapsis,

identidad de acción con mecanismos transmisores endógenos y respuesta a agentes farmacológicos similares a neurotransmisores endógenos (WERMAN, 1966; DUDEL, 1986).

El aminoácido GABA (gamma-aminobutirato), sintetizado a partir del ácido glutámico, no es un constituyente de las proteínas pero puede ser responsable de desempeñar su función como neurotransmisor en muchos más lugares de SNC que otros compuestos como la acetilcolina, norepinefrina, y dopamina (SNYDER y col., 1973). Otros aminoácidos que también actúan como neurotransmisores, tales como glicina y glutamato, son más difíciles de caracterizar por su distribución y asociación con el metabolismo intermediario.

Más recientemente (1987), RASSIN incluye en tres categorías los aminoácidos relacionados íntimamente con la neurotransmisión: Hay algunos como GABA, β -alanina, taurina y cistationina, que son aminoácidos pero no son precursores de proteínas. Hay otros como glutamato, aspartato y glicina, que están íntimamente implicados en el metabolismo intermediario, son precursores de proteínas y pueden ser neurotransmisores. Por último, hay aminoácidos que sirven como precursores de otros neurotransmisores, tal como la fenilalanina y la tirosina (dopamina, norepinefrina), triptófano (serotonina) e histidina (histamina).

El ácido cisteín-sulfínico es un precursor metabólico de la taurina (KILPATRICK y MOZLEY, 1986). La taurina, es el segundo aminoácido, después del glutamato, más abundante en el SNC y su nivel varía enormemente según la región (BUREAU y OLSEN, 1991).

Algunos autores dedican sus estudios a ver la distribución regional de aminoácidos azufrados y de otros aminoácidos en el cerebro de rata. Para aquellos interesados en el tema pueden recurrir a la publicación de KILPATRICK y MOZLEY (1986) y de MERELI y GALLYAS (1964).

Pero la vía metabólica más importante de aminoácidos en el cerebro, es la síntesis proteica (GOLDSTEIN y col., 1977). Los aminoácidos cargan al tRNA y la iniciación de la cadena, parece ser un proceso rápido en el cerebro (LITTLE y col., 1970), no sucede así con su elongación y terminación, que están limitadas (LIU y col., 1973), lo cual difiere de otros tejidos.

PARKS y col. (1976), haciendo uso de la retina aislada de ratón, estudian el papel de los aminoácidos en la regulación de la síntesis proteica en el SNC. Ellos han pensado que bajo condiciones normales la síntesis proteica en el SNC es sustrato independiente, pero en situaciones patológicas llega a ser limitada por el sustrato y la tasa afectada por el transporte de aminoácidos a través de la BHE.

El pool precursor para la síntesis proteica pueden ser los aminoácidos situados en los espacios intracelulares o extracelulares (plasma). Aunque LAJTHA y DUNLOP (1976) y AMES y PARKS (1976) concluyen que el espacio intracelular es el pool precursor mayor, posteriormente REITH y col. (1979) consideran ambos modelos ya que el pool extracelular es importante cuando el suministro de aminoácidos es bajo y el intracelular cuando es alto.

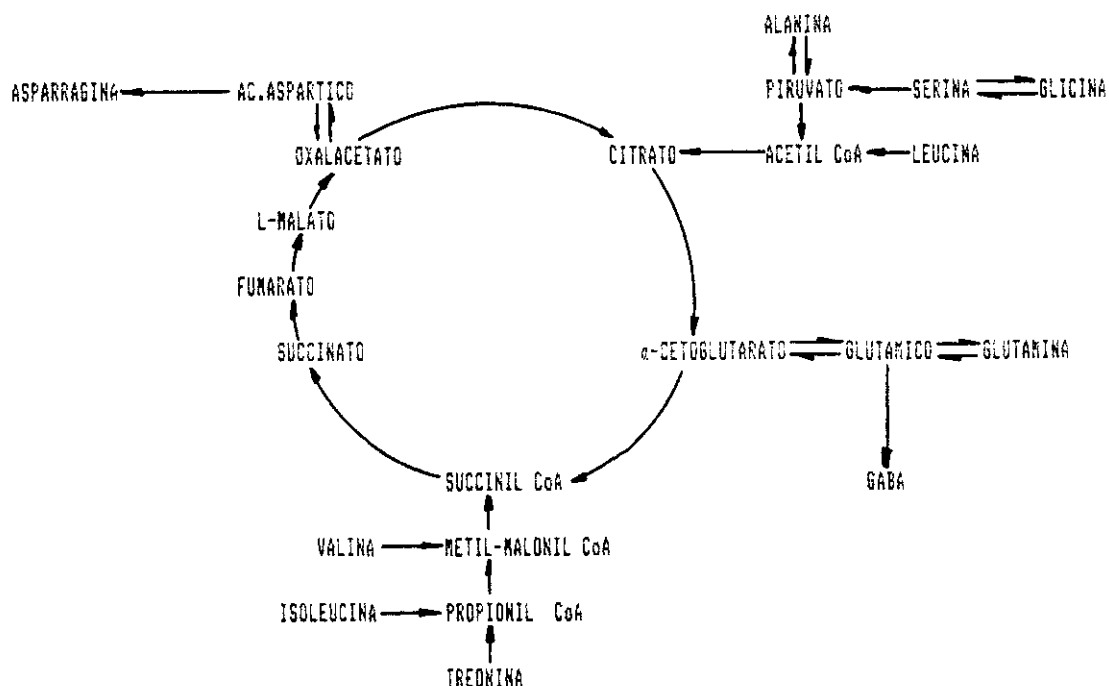
Para que los aminoácidos puedan realizar todas las funciones mencionadas es necesario que sean captados por el cerebro mediante mecanismos apropiados de transporte (PARDRIDGE, 1977b). Según PARDRIDGE y col. (1981), se admite la existencia de una barrera hematoencefálica dividida en dos subgrupos, dependiendo de la superficie capilar en contacto con las células cerebrales y su distribución anatómica. Por un lado, se encuentra la barrera hematoencefálica (BHE) propiamente dicha, que está formada por microcapilares cuyo endotelio está unido estrechamente a las neuronas y glía, con escaso espacio intersticial y picnocirosis, su superficie es 5000 veces superior, según CRONE (1971), a la denominada barrera sanguínea cerebroespinal (BSCE), que se encuentra situada en los órganos circunventriculares (plexos coroideos, eminencia media, órganos vasculares de la lámina terminal cerebral, órgano subfornical y área postrema) y está formada por capilares porosos que permiten una activa picnocirosis; el líquido intersticial se separa del fluido cerebro-espinal por células epéndimales que impiden la distribución de las sustancias circulantes hacia el fluido cerebro-espinal. La BHE se encuentra en el 99% de los capilares cerebrales, mientras que aunque la BSCE se encuentra en un número de capilares mucho menor (BRIGHTMAN, 1977) es importante en lo que atañe a la rápida distribución de nutrientes circulantes al espacio intersticial por difusibilidad, sin mediación lipídica o mediante transportadores (PARDRIDGE y col., 1981).

Las medidas cuantitativas del transporte de nutrientes a través de la

BHE se realiza por la técnica de infusión constante o por la de inyección única. Ambas se basan en la tasa de influjo sobre la base de las constantes cinéticas de la K_m y velocidad máxima de reacción de transporte (V_{max}), utilizándose ecuaciones para convertir el índice de captura en medidas cuantitativas de la BHE (CRONE, 1965; PARDRIDGE y col., 1982).

Se puede, por tanto, concluir que los cambios potenciales de los aminoácidos libres en plasma influyen mediante dos etapas en la progresión de un aminoácido desde el plasma al SNC. La primera etapa es el transporte a través de la BHE, que es competitivo y no saturado, lo que hace que sea un sistema abierto a modificaciones por cambios en el pool precursor. La segunda etapa es su metabolismo una vez dentro del SNC, ya que existe la posibilidad de ser sintetizado como neurotransmisor respondiendo a los cambios del pool precursor (COHEN y WURTMAN, 1979). Con respecto a la segunda etapa, estudios *in vitro* y en animales han demostrado que la K_m para un enzima es superior a la concentración del precursor en el cerebro para esa enzima, por tanto la enzima no está saturada. Si la enzima no está saturada con el precursor, y aumenta en el pool el precursor, aumenta la síntesis del neurotransmisor hasta un punto en que la enzima esté saturada. Varios sistemas de neurotransmisores tienen éstas propiedades y de tal modo que están abiertos a regulación por cambios en el pool precursor. Estos sistemas metabólicos incluyen los mecanismos sintéticos para serotonina, dopamina, noradrenalina, S-adenosilmetionina y acetil-colina. Por tanto, las etapas de síntesis y catabolismo de varios sistemas importantes de transmisores no están saturados y pueden responder a variaciones en la disponibilidad del precursor, aumentando la síntesis o disminuyéndola, modificando así la actividad neuronal del SNC.

La regulación del transporte de aminoácidos y otros nutrientes a través de la BHE, podría estar a cargo de la insulina, tensión arterial y hormona tiroidea, aparte de la concentración plasmática y cerebral de cada nutriente así como por la alimentación, pero dicha regulación aún no está exactamente clarificada.



* CICLO DE KREBS Y SU RELACION CON LOS AMINOACIDOS

* AAN

Los AAN esenciales (leucina, isoleucina, valina, tirosina, triptófano y fenilalanina) que son requeridos en el metabolismo cerebral, son transportados desde el plasma al cerebro mediante un sistema de transporte específico de los capilares cerebrales de la BHE. No se trata de un transporte activo, sino que es un proceso mediado por un transportador. Los AAN junto con la metionina, treonina e histidina, compiten entre ellos por ocupar el transportador debido a que este se encuentra saturado a las concentraciones plasmáticas normales (PARDRIDGE, 1977a,b; MANS y col., 1980; SMITH y col., 1987; TACKMAN y col., 1990; THURMOND, 1990). Parece que la fenilalanina y la leucina ocupan más del 50% de los lugares de transporte en condiciones normales. Este sistema de transporte tiene un destacado papel en el control de la concentración de dichos aminoácidos en el cerebro, ya que el paso a través de la BHE es la etapa limitante para el intercambio de aminoácidos entre el plasma y el fluido intracelular cerebral. Mediante el control de la concentración de estos aminoácidos en el cerebro, el sistema de transporte puede afectar varias vías metabólicas cerebrales, tales como

la síntesis de serotonina que no está saturada en condiciones normales por no haber precursor disponible (MATHESON y col., 1981).

Esta competición por el transporte entre los aminoácidos hace que las variaciones en sus concentraciones a nivel plasmático no se vean perfectamente reflejadas a nivel cerebral.

Las interacciones entre estos aminoácidos han sido estudiadas viendo la relación entre un aminoácido neutro individual y la suma de todos los AAN. Así se consigue dar una visión de la entrada de ese aminoácido particular al cerebro. PARDRIDGE y col. (1977b) han desarrollado constantes cinéticas en la rata para la mayoría de los AAN plasmáticos, utilizando la técnica del Índice de Captura Cerebral, para describir el influjo cerebral de este grupo de aminoácidos en presencia de varias concentraciones plasmáticas. Desarrollaron una K_m y una V_{max} para cada aminoácido y luego calcularon una aproximación matemática para derivar una K_m verdadera, basada en la concentración de aminoácidos en el plasma para luego calcular el influjo de aminoácidos mediante una fórmula.

Es interesante considerar, que los AAR (leucina, isoleucina y valina) se encuentran en mayor proporción que el resto de los AAN (especialmente el triptófano que se une a la albúmina) en forma libre a nivel plasmático, lo que está en favor de una mayor captación por el cerebro. Así, la administración de una cantidad grande de leucina a una rata, produce una disminución del pool cerebral del resto de los AAN, lo que se asocia con un descenso de la ingesta.

Los AAR son degradados, a diferencia de otros aminoácidos, en el conjunto del organismo más que en el hígado. Sus grupos amino son transaminados por las enzimas transaminasas, que se encuentran distribuidas ampliamente por todos los tejidos, para formar glutamato, precursor de alanina y glutamina, que son liberados en la sangre a partir de tejidos como el músculo, transportando los grupos amino de los AAR hacia el hígado. Algunos tejidos como el músculo, tienen una capacidad limitada en la degradación de los AAR, liberando a la sangre los ácidos cetónicos de cadena ramificada, producto de la transaminación. El control del catabolismo de los AAR se realiza a través de la descarboxilación oxidativa de los mismos por sus deshidrogenasas en el hígado. El grado de activación de éste enzima, así como el resultado de la defosforilación están

influenciadas por el estado nutricional del organismo. La enzima es así activada por la leucina o el cetoácido derivado.

Al igual que los AAR, los AAA (aminoácidos aromáticos: tirosina, triptófano y fenilalanina) son utilizados por el cerebro por una vía limitada por las enzimas intracelulares, las cuales tienen una K_m relativamente alta. Son convertidos en neurotransmisores por enzimas cuya actividad está limitada por el sustrato (KREBS y LUND, 1977), el cual depende de su transporte a través de la BHE (GOLDSTEIN y col., 1977).

La treonina apenas es metabolizada en el cerebro (GOLDSTEIN y col., 1977). GAITONDE (1975), sin embargo, ha demostrado que en deficiencia de tiamina, la treonina es convertida en glutamato, aspartato, GABA y glutamina al entrar en el ciclo tricarboxílico como succinil-CoA. Aunque el metabolismo de los AAR es dependiente de la tiamina, la degradación de la treonina es tiamina independiente (LE FEVRE, 1972).

En general, se puede decir que el transporte de AAN a través de la BHE está controlado por su concentración en el cerebro (GOLDSTEIN y col., 1977).

* ARGININA

La arginina plasmática pasa, atravesando la BHE, al cerebro y aquí bien se oxida a urea, que pasa al plasma, o bien interviene en la síntesis proteica del cerebro. Lo mismo sucede con la leucina.

La arginina, también puede producir guanidinoacetato, precursor de la creatinina. Pero aunque la síntesis de urea tiene lugar en el cerebro (JUNG y RAMPAL, 1977), parece que la síntesis de guanidinoacetato en cerebro es casi inapreciable (KAMMULA, 1976).

Es sabido, que el cerebro puede producir arginina a partir de citrulina y aspartato, y que la arginina cerebral se transforma en ornitina y urea (JUNG y RAMPAL, 1977). Así, una función de la actividad arginasa, podría ser la producción de ornitina, el precursor de las poliaminas (KINTNER y col., 1980).

* PRECURSORES Y SINTESIS DE LOS NEUROTRANSMISORES

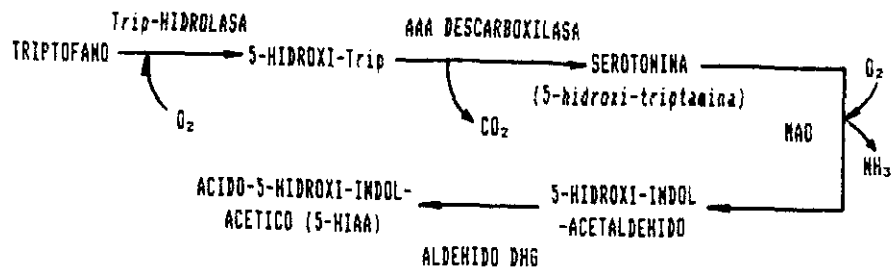
Estudios en la década pasada han demostrado que la síntesis de neurotransmisores está directamente influida por la disponibilidad de precursores procedentes de la dieta y la sangre. Las neuronas son vulnerables a cualquier variación de los nutrientes sanguíneos (GREENWOOD y CRAIG, 1987).

Serotonina, histamina y glicina usan como precursores el triptófano (FERNSTROM y col., 1973), histidina (ENWONWU y WORTHINGTON, 1974) y treonina (MAHER y WURTMAN, 1980), respectivamente, procedentes de la dieta. Las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y, probablemente, la adrenalina) usan como precursor la tirosina, un aminoácido semiesencial neutro de cadena larga, disponible directamente de la dieta y sólo derivado del aminoácido esencial fenilalanina (WURTMAN y col., 1974; GIBSON y WURTMAN, 1977). La acetil colina, requiere colina como precursor. Aunque la colina puede ser sintetizada en el cerebro (BLUSZTAJN y WURTMAN, 1981), la disponibilidad de éste precursor en la dieta y en el plasma también influye en la síntesis de acetil colina (COHEN y WURTMAN, 1976).

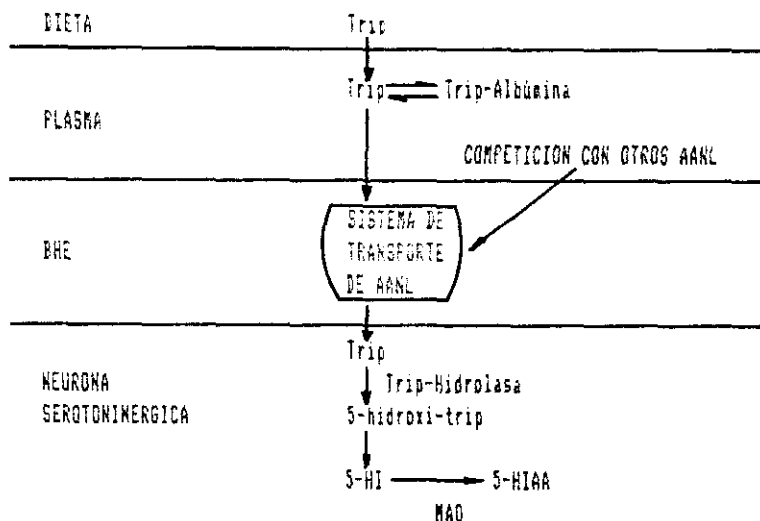
Con la excepción de triptófano, tirosina, histidina y treonina, las variaciones de la concentración de aminoácidos cerebrales por encima de la normalidad, no se ha demostrado que influyan en la síntesis de neurotransmisores. Los aminoácidos que funcionan directamente como neurotransmisores, GABA y aminoácidos ácidos (glutamato y aspartato) etc., son aminoácidos no esenciales de la dieta y el metabolismo dentro de la neurona parece regular su producción y liberación (WURTMAN y col., 1981).

- Serotonina:

En 1953 se descubre que la serotonina se encuentra presente en el SNC de mamíferos, hoy se sabe que juega un papel crítico en la modulación de una gran variedad de procesos fisiológicos y de comportamiento tales como: Regulación de la temperatura, sensibilidad emocional, comportamiento sexual, apetito para carbohidratos y proteínas, agresión y sueño (JOUVET, 1983; NICOLL y col., 1990).



* SINTESIS Y DEGRADACION DE SEROTONINA



La serotonina es sintetizada a partir de L-triptófano, procedente de la dieta, dentro de la neurona serotoninérgica mediante la triptófano hidrolasa que actúa en la etapa limitante de la síntesis (FERNSTROM, 1976; MARCHBANKS, 1966). Este enzima no se satura a las concentraciones de triptófano normales en el cerebro. Por tanto, el nivel cerebral de triptófano es lo que influye en la actividad de síntesis de serotonina. Numerosos estudios han confirmado que esto es así (DANIEL y col., 1975; FERNSTROM, 1976; LEATHWOOD y ASHLEY, 1983a,b; BENDER, 1986; GREENWOOD y CRAIG, 1987). La concentración de triptófano en el cerebro depende de la composición de aminoácidos plasmáticos. Pero su entrada al cerebro no es una función simple. Por una parte, depende de la unión reversible del triptófano a la albúmina plasmática (LEATHWOOD, 1986). Sólo de un 10 a un 15%, del triptófano plasmático, se encuentra en forma libre (McMENANY y ONCLEY, 1958) y éste es, precisamente, el que puede ser transportado al cerebro (LEATHWOOD, 1986; PARDRIDGE, 1977b). Esto

conduce a pensar que el triptófano libre, más que el total, determina su nivel en el cerebro (GESSA y TAGLIAMENTE, 1974; KNOTT y CURZON, 1972).

Por otro lado, la entrada de triptófano al cerebro depende del sistema de transporte de AANL (aminoácidos neutros de cadena larga) y debe competir con valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina y metionina, treonina e histidina (PARDRIDGE, 1977b; LEATHWOOD, 1986). Así, cambios en la concentración de uno de estos aminoácidos afecta a la captura por el cerebro del resto de ellos (PARDRIDGE, 1977b).

Algunos autores han pensado que el triptófano se une débilmente a la albumina (MADRAS Y COL., 1974a,b), teniendo mucha mayor afinidad por el transportador de la BHE (YUWILER y col., 1977).

Los niveles de triptófano en cerebro bajo condiciones fisiológicas normales son de 10 a 50 μ M (GREENWOOD y CRAIG, 1987).

Mientras que es bien sabido que, el valor plasmático de la relación triptófano/AANL es un buen indicador del nivel de triptófano cerebral, no se sabe bien la influencia del triptófano plasmático unido a la albúmina (GREENWOOD y CRAIG, 1987). El triptófano plasmático total y/o libre está en relación inversa con el triptófano cerebral (LEATHWOOD y ASHLEY, 1983a,b).

Según PARDRIDGE, en sus diferentes estudios, las características cinéticas del transporte a través de la BHE son similares en hombre y rata.

Al menos, hay dos tipos de transportadores para el paso de triptófano al cerebro:

- a.- Sistema L: Para aminoácidos neutros como leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina, treonina y metionina (OLDENDORF, 1971).
- b.- Anti-transportador: Hace que entre triptófano al cerebro y salga glutamina (JAMES y col., 1979). Este mecanismo puede ser importante cuando la actividad de la serotonina está aumentada en la intoxicación amónica, pero no está claro que ejerza un papel importante en el transporte normal de triptófano al cerebro.

En cuanto al control dietario de la síntesis de serotonina cerebral, hay que señalar que alteraciones en el contenido de triptófano en la dieta pueden influir en el nivel de triptófano y serotonina cerebrales. Esto ha sido estudiado por numerosos autores (MUNRO, 1970; LYTLE y col., 1975; KANTAK y col., 1980; LASLEY y THURMOND, 1985, etc.). El suplemento a la dieta con leucina (YUWILER y GELLER, 1965; RAMANAMURTHY y SRIKANTIA, 1970) o fenilalanina (YUWILER y LOUTTIT, 1961; CULLEY y col., 1962; GREEN y col., 1962; YUWILER y GELLER, 1966) reduce el contenido de serotonina cerebral. Ello parece ser debido a que aumenta la competición para la captura por el cerebro. Sin embargo, también se piensa que específicamente esos aminoácidos tengan cierto efecto sobre la serotonina cerebral. Por un lado, la leucina interfiere con la neurona serotoninérgica afectando a la captura o liberación de la serotonina almacenada en los gránulos (RAMANAMURTHY y SRIKANTIA, 1970) y por otra parte, la fenilalanina inhibe la triptófano hidrolasa (LOVENBERG y col., 1968) reduciendo el nivel de serotonina (GREENWOOD y CRAIG, 1987).

El suplemento de treonina a una dieta baja en proteínas deprime el crecimiento de ratas en un 30% y desarrolla cataratas que son aliviadas con un suplemento de triptófano. Por tanto, las cataratas se desarrollan en ratas alimentadas con deficiencia en triptófano.

Se podría también pensar, que la disminución de serotonina puede deberse a un aumento de la actividad de la MAO cerebral.

Como mecanismo compensatorio, un bajo nivel de triptófano en el cerebro causa un aumento de la actividad triptófano hidrolasa (DALAL y col., 1987).

El contenido proteico de la dieta es inversamente proporcional a la relación plasmática triptófano/AANL, mientras que el contenido de carbohidratos de la dieta es directamente proporcional a dicha relación (WURTMAN y col., 1981; FERNSTROM, 1983; LI y ANDERSON, 1983; SVED, 1983; LEPROHON-GREENWOOD y ANDERSON, 1986).

Los cambios que induce la dieta sobre los patrones de aminoácidos plasmáticos dependen de la liberación de insulina que se produce después de la

ingestión de alimento. La insulina estimula la captura por los tejidos de todos los aminoácidos a excepción del triptófano. Estos estudios se deben a WURTMAN y FERNSTROM, 1975; FERNSTROM y col., 1975, 1976; WOODGER y col., 1979; CRANDALL y FERNSTROM, 1980; LI y ANDERSON, 1982; GLAESER y col., 1983; MOLLER, 1985; GLANVILLE y ANDERSON, 1985.

La oxidación del triptófano varía durante el ciclo menstrual en las hembras y quizá ello influya en la disponibilidad del triptófano para sintetizar serotonina (DALVIT-McPHILLIPS, 1983; HRBOTICKY, 1986).

Ratas que consumen una dieta alta en proteínas (tiene muchos AANL) muestran un aumento de triptófano menos importante en cerebro- posiblemente debido a la alta circulación de AANL (compiten con el triptófano)- que ratas que consumen una dieta baja en proteínas (MORRIS, 1987).

Los ácidos grasos no esterificados compiten con el triptófano en su unión a la albúmina plasmática. Esto puede tener interés ya que bajo condiciones fisiológicas normales (Mc MENAMY, 1965) se puede producir un aumento de triptófano libre (BENDER y col., 1975). Así, en el hombre la concentración de triptófano plasmático libre aumenta en respuesta al ayuno y al ejercicio, mientras que la concentración de ácidos grasos no esterificados aumenta o disminuye en respuesta a la ingesta de alimentos (D.A. BENDER, observaciones no publicadas).

- Catecolaminas:

Las neuronas catecolaminérgicas del SNC influyen en la regulación de la presión sanguínea (HEISE y KRONEBERG, 1972; VAN ZWEITEN, 1973).

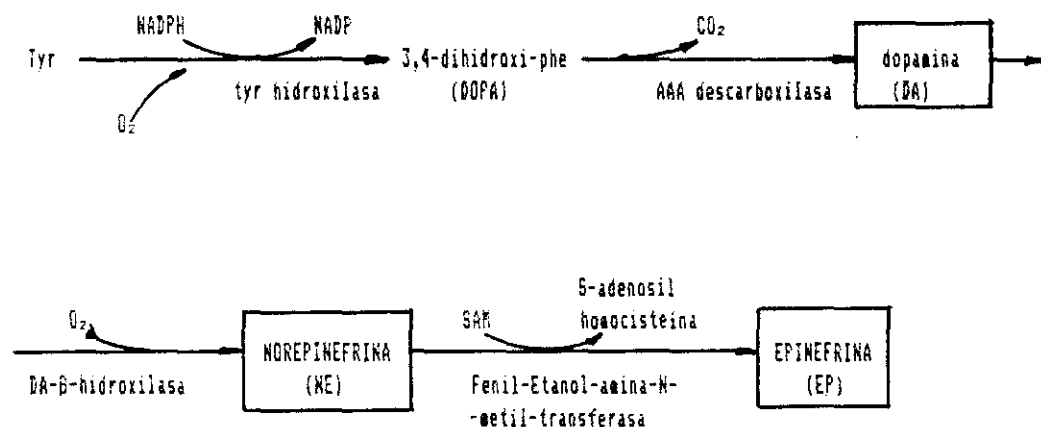
Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia gris son importantes en la iniciación de la actividad motora (COTZIAS y col., 1969).

Las neuronas norepinefrínicas del locus cerebeloso y del tronco cerebral, están involucradas en el control de la ansiedad y del despertar (GRAY, 1982). Además, junto con las neuronas serotoninérgicas, pueden tener un papel especial en la depresión y otros desórdenes afectivos.

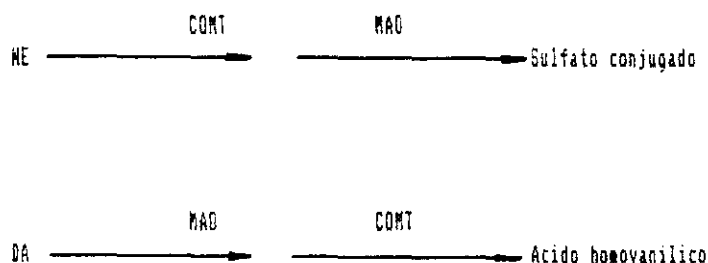
El triptófano y la tirosina compiten para su transporte a través de la BHE, y los neurotransmisores que producen parecen tener funciones opuestas. La serotonina tiende a facilitar el sueño (JOUVET, 1983), mientras que las catecolaminas pueden aumentar la vigilia y la actividad motora (GRAY, 1982).

Las catecolaminas son sintetizadas a partir de la tirosina mediante enzimas anabólicas presentes en la neurona (GREENWOOD y CRAIG, 1987).

La tirosina hidrolasa, al igual que la triptófano hidrolasa en neuronas serotoninérgicas, está en alta proporción en las neuronas catecolaminérgicas y requiere oxígeno, hierro y tetrahidrobiopterina como cofactores (NAGASTSU y col., 1964; UDENFRIEND, 1966). Es la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas y está casi completamente saturada con la concentración normal de tirosina cerebral, a diferencia de lo que sucede con el triptófano. Se activa bajo la influencia de drogas, hormonas, stress e hipertensión, de forma que, el turnover de catecolaminas aumenta y llega a ser dependiente del precursor (MASSERANO y WEYNER, 1983). Sin embargo, a diferencia de la serotonina, no depende tanto esta regulación del precursor. Ello es cierto sólo bajo determinadas circunstancias (GREENWOOD y CRAIG, 1987). Varios mecanismos han sido propuestos como reguladores de la tirosina hidrolasa, incluyendo la inhibición que supone el producto final (UDENFRIEND y col., 1965; IKEDA y col., 1966; SPECTOR y col., 1967; HARRIS y ROTH, 1971; WEINER y col., 1972) y la ocupación de receptores (WALTERS y ROTH, 1976; ROTH y col., 1978).



* SINTESIS DE CATECOLAMINAS



* DEGRADACION DE CATECOLAMINAS

Mientras que el mecanismo de control no se sabe, algunos estudios indican que la actividad de la tirosina hidrolasa es regulada de forma que no se observa acumulación de catecolaminas (FERNSTROM, 1983; SVED, 1983).

La administración de tirosina a animales tiene poco o nulo efecto sobre el nivel de catecolaminas cerebrales (MELAMED y col., 1980; FERNANDO y CURZON, 1981; SVED y FERNSTROM, 1981). Por otro lado, la administración de AANL para disminuir la tirosina cerebral, reduce la síntesis de catecolaminas cerebrales (WURTMAN y col., 1974; CARLSSON y LINQVIST, 1978). De estos hechos, GREWOOD y CRAIG (1987), señalan que el cerebro es más sensible a reducciones que a elevaciones de tirosina.

Cuando se aumenta la actividad neuronal, por estimulación farmacológica o eléctrica, se detecta un aumento de actividad de la tirosina hidrolasa. Ello se asocia al calcio o al AMPcíclico (JOH y col., 1978; YAMAUCHI y FUJISAWA, 1979).

Aunque la DOPA se transforma en dopamina, alguna cantidad de DOPA sí se puede encontrar en el cerebro (THIED y KEHR, 1981).

La contribución de epinefrina al contenido cerebral de catecolamina es pequeña.

Si se hace referencia al control dietario de la síntesis de catecolaminas, se ha de señalar que dicha síntesis a nivel cerebral puede llegar a ser

dependiente del precursor cuando son catabolizadas activamente. La principal fuente de tirosina cerebral es una dieta rica en tirosina y fenilalanina (GREENWOOD y CRAIG, 1987). La fenilalanina es rápidamente hidroxilada a tirosina por la fenilalanina hidroxilasa hepática (ELWYN, 1970). Por tanto, las alteraciones inducidas por la dieta en la biodisponibilidad de aminoácidos aromáticos puede influir sobre los niveles de tirosina cerebrales (GREENWOOD y CRAIG, 1987).

La entrada de tirosina al cerebro depende de su captura por el transportador de AANL. Además, la relación tirosina/AANL, más que el nivel de tirosina plasmática, describe mejor el nivel de tirosina cerebral (PARDRIDGE, 1977b). El transporte de tirosina está en relación directa con la proporción de tirosina en el plasma (WURTMAN y col., 1981). El nivel plasmático de catecolaminas y su síntesis depende de la proporción de proteínas y carbohidratos de la dieta y del tiempo de administración de dicha dieta. Aumentando las proteínas (0 a 40%) y disminuyendo los carbohidratos, se eleva la relación plasmática tirosina/AANL y la concentración de tirosina cerebral (FERNSTROM y FALLER, 1978; GLAESER y col., 1983). Esto ocurre debido a que el nivel de tirosina en el plasma aumenta relativamente más que la competencia de AANL, debido al efecto combinado de la insulina que induce la captura de aminoácidos de cadena ramificada por el músculo y la conversión en el hígado de fenilalanina en tirosina (GREENWOOD y CRAIG, 1987).

Mientras hay una relación directa entre una dieta alta en proteínas, y la concentración de tirosina en cerebro, tratándose de una administración única de la dieta, sucede a la inversa cuando la administración de este mismo tipo de dieta es crónica. Así, el nivel de tirosina cerebral es más bajo en animales alimentados con dieta alta en proteínas (40% de caseína) con un metabolismo de catecolaminas relativamente poco afectado (AGHRANYA y WURTMAN, 1987; GRANVILLE y ANDERSON, 1985). En esta situación el nivel de tirosina plasmática no cambia, probablemente debido a un aumento de la actividad de la tirosina aminotransferasa hepática, así, aumenta la competencia con los AANL y la competición para la captura por el cerebro de tirosina. Esta respuesta metabólica se observa durante tres días con 30% de caseína (YOKOGOSHI, 1985).

En contraste a este efecto que ejercen dietas altas en proteínas, dietas suplementadas con tirosina, da como resultado una elevación crónica de tirosina en

plasma y cerebro y la actividad de la tirosina aminotransferasa no parece ser afectada (GIBSON, 1985). El efecto de la elevación crónica de tirosina cerebral sobre el metabolismo de catecolaminas no ha sido muy estudiado. El metabolismo de catecolaminas puede ser aumentado proporcionando más precursor y las neuronas analizadas se ha visto que son dependientes del precursor (JOHNSTON y col., 1983).

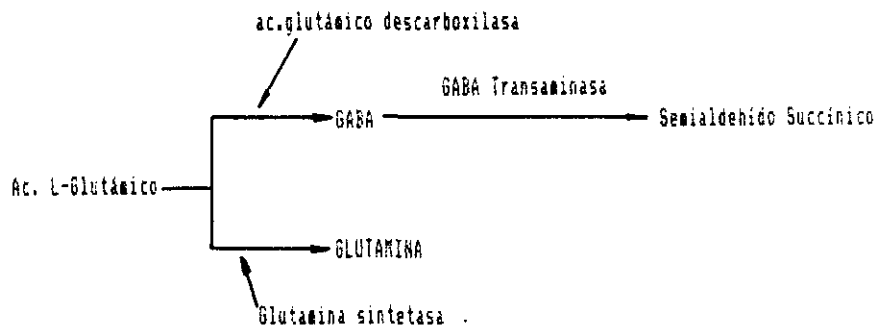
La relación entre la disponibilidad de tirosina y el metabolismo de catecolaminas durante el desarrollo neuronal no ha sido bien estudiada.

Las catecolaminas hacen su presencia tempranamente en la organogénesis cerebral (OLSON y SEIGER, 1972) más o menos en el mismo tiempo que la serotonina.

La actividad de la tirosina hidroxilasa aumenta durante la gestación aproximadamente un 25% del valor del adulto y sobre las cuatro semanas de vida, se iguala al nivel del adulto (McGEER y col, 1971; COYLE y AXELROD, 1972).

- GABA y Glicina:

Son aminoácidos transmisores inhibitorios que se hallan en la mayor parte de las células del cerebro a una concentración de 200 a 1000 veces más que otros neurotransmisores.



* SINTESIS Y DEGRADACION DEL GABA

El GABA se forma a partir del ácido glutámico que proviene de la glutamina o alfa-cetoglutarato. Esta síntesis, por tanto, depende indirectamente de la concentración de glucosa. El glutamato y glutamina, juntos, constituyen el 60% de los aminoácidos libres en el tejido cerebral.

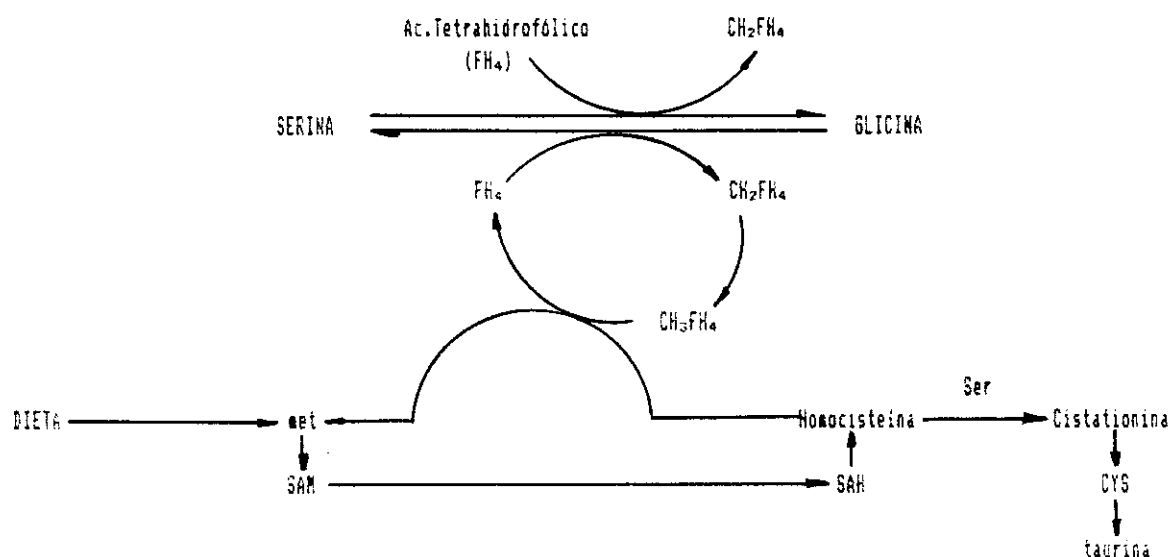
Como importante vía metabólica del GABA se considera el denominado "shunt", que constituye un bucle cerrado que sirve para conservar el suministro de GABA. La primera etapa en éste "shunt" es la transaminación del alfa-cetoglutarato a ácido glutámico, el cual es después descarboxilado para formar GABA. La etapa siguiente es clave, el GABA es transaminado para formar semialdehído succínico, que pasará a formar ácido succínico. Por tanto el glutamato garantiza el continuo suministro de GABA. Las enzimas de este "shunt" están unidas a la mitocondria, algunas se encuentran libres en el citoplasma neuronal y otras en el citoplasma de la glía, de manera que se conserva entre éstos compartimentos un equilibrio en la síntesis y degradación del GABA.

En cuanto a la glicina, se puede considerar que es otro neurotransmisor inhibitorio (más débil que el GABA) sodio dependiente. Se encuentra en todos los tejidos, aunque en mayor concentración en la médula espinal y puente de Varolio.

La glicina no es un aminoácido esencial, aparece en la proteína dietaria en una proporción de 1-5%. Puede ser sintetizada a partir de la glucosa y otros sustratos en el tejido nervioso. Atraviesa fácilmente la BHE y es transportada por la sangre. Se incorpora a péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos y sus fragmentos participan en otras secuencias metabólicas.

El precursor inmediato de la glicina es la serina y en el cerebro se forma a partir de glucosa vía serina y no de su transporte a través de la BHE (NEAL, 1971).

Sólo una fracción de glicina inmersa en los eritrocitos es intercambiable con el plasma, pudiendo ser el glutatión, un tripéptido rico en glicina de elevada concentración en glóbulos rojos, la fuente principal del aminoácido en los eritrocitos (DARMAUN y col., 1989).



*** INTERCONVERSION SERINA-GLICINA Y SU RELACION CON LA FORMACION DE TAURINA**

- Serina:

El principal interés de este aminoácido es que se convierte en glicina en el SNC. Su acción iontoforética es más débil que en la glicina y se halla en concentraciones más bajas que esta en el SNC, excepto en el telencéfalo y cerebelo (CURTIS y col., 1968).

- Glutamato y aspartato:

El ácido glutámico se incorpora a proteínas y péptidos, está relacionado con la síntesis de ácidos grasos, regula, junto con la glutamina, los niveles de amonio y el balance osmótico y aniónico, es precursor del GABA y de algunos metabolitos del ciclo de Krebs, forma parte constituyente de los cofactores intermediarios, glutation y ácido fólico. En el cerebro se halla a una concentración 3-4 veces superior a la taurina, glutamina o aspartato.

El glutamato junto con el aspartato, actúan como neurotransmisores

excitatorios debido a su actividad iontoforética, además de ser utilizados para otros fines metabólicos.

No son aminoácidos esenciales ya que pueden ser sintetizados a partir de glucosa y otros precursores del ciclo tricarboxílico en las mitocondrias de todos los tejidos-incluido el cerebro- por transaminación.

Tienen alta afinidad y especificidad para acumularse en determinadas terminaciones nerviosas (cortico-estriadas, corteza entorrinal hipocampal y retinotectal) (WOFSEY y col., 1971).

El cerebro, al ser capaz de sintetizarlos fácilmente, no necesita apenas captarlos desde la sangre, por lo que el sistema transportador es de muy baja capacidad (OLDENDORF, 1970) y se piensa en la posibilidad de que este sistema facilite el flujo desde el espacio intersticial cerebral a sangre ya que cuotas altas de estos aminoácidos resultan tóxicas (OLDENDORF, 1971).

- Histamina:

La histamina es una hormona hística que estimula el útero y la fibra muscular lisa.

En el cerebro se encuentra a una concentración de 50 ng/g. En este tejido hay dos pools de histamina, uno neuronal y otro situado en los mastocitos. Las más altas concentraciones se hallan en ciertos núcleos del hipotálamo, glándula pineal, sustancia negra, pituitaria posterior y núcleo del rafe.

Se cree que el aumento de la histidina descarboxilasa (enzima que descarboxila la histidina para formar histamina) está asociada con el desarrollo de neuronas histaminérgicas.

La histamina no difunde rápidamente a través de la BHE, excepto en animales recién nacidos, lo cual indica que el cerebro la sintetiza localmente.

El catabolismo en el cerebro se lleva a cabo por metilación (VAN BALGOOY y col., 1972).

La histamina deprime la tasa de despolarización de muchas interneuronas y tiende a hiperpolarizar motoneuronas de la médula espinal, formación reticular del tallo cerebral y células de Purkinge cerebelares.

2.3.3.- Efectos nutricionales sobre la biodisponibilidad de aminoácidos y desarrollo cerebral

Es sabido que una nutrición inadecuada durante el desarrollo produce alteraciones estructurales y químicas a nivel cerebral. En algunos casos, esos cambios pueden afectar a las células neuronales y producir defectos permanentes fisiológicos, bioquímicos y de conducta. A veces, estos defectos son reversibles (DAVID y ASHLEY, 1986).

El suplemento inadecuado de aminoácidos influye sobre el desarrollo cerebral a través de su interacción con la síntesis de proteínas o la formación de neurotransmisores. El efecto del triptófano en la producción de serotonina es un ejemplo de lo dicho anteriormente. La serotonina es un importante modulador del desarrollo normal del cerebro y se usa como signo de desarrollo en varias situaciones morfogenéticas.

La pregunta es cómo exactamente se pueden apreciar, identificar y prevenir las circunstancias bajo las que un suplemento nutricional alterado o un defecto en la metabolización periférica de aminoácidos causará alteraciones irreversibles del desarrollo normal del cerebro. La respuesta no es fácil, un desequilibrio nutricional simple puede tener consecuencias muy diferentes y depender de muchos factores. El primer factor es el estado de maduración del cerebro en desarrollo cuando se ve enfrentado a un desequilibrio nutricional particular.

Hay ciertos periodos durante el desarrollo cerebral, en los que el cerebro, o mejor dicho, ciertas áreas del mismo, son vulnerables a cambios por un suplemento nutricional.

Además, hay factores que de alguna manera (no se ha determinado con exactitud) interfieren en el desequilibrio nutricional (y así aumentan o

disminuyen las consecuencias del desequilibrio nutricional sobre el desarrollo cerebral) durante el desarrollo cerebral. Estos factores se clasifican en:

- a.- Factores extrínsecos: Otros nutrientes, factores medioambientales, emocionales, stress, etc.
- b.- Factores intrínsecos: Variaciones individuales en la eficacia y en el estado de maduración y mecanismos involucrados en el control del suplemento de nutrientes al cerebro.
- c.- Un tercer factor es la plasticidad: Este efecto tampoco es muy explicado. Actúa después de haberlo hecho el desequilibrio nutricional. Como consecuencia de dicho desequilibrio, el desarrollo neuronal es anormal. Una forma de compensar éste defecto, al menos en parte, es mediante un mayor desarrollo de las dendritas y axon neuronal. Estos defectos neuronales que se producen durante el desarrollo cerebral son irreversibles a lo largo de la vida (HUETHER, 1989).

2.3.3.1.- Consecuencias de una disponibilidad de aminoácidos inadecuada sobre la síntesis proteica y desarrollo cerebral

Durante el crecimiento cerebral, el anabolismo proteico es mayor que el catabolismo. Los requerimientos de aminoácidos son excepcionalmente altos y la síntesis proteica neuronal es dependiente principalmente de un adecuado suplemento de , al menos, aquellos aminoácidos que son esenciales para el crecimiento cerebral. Hay evidencias de que variaciones moderadas en el suplemento de aminoácidos cerebrales durante poco tiempo no afectan al desarrollo cerebral significativamente. Pero cuando esta situación se prolonga, haciéndola crónica, sí se afecta el suplemento de aminoácidos al cerebro en ciertas enfermedades, en errores metabólicos innatos o malnutrición proteica (HUETHER, 1989). Con variaciones en la disponibilidad de aminoácidos, la síntesis de las especies proteicas más complejas se ve más afectada que la de las proteínas simples, de cadena corta. Esto fué demostrado por HOMMES y col. (1982). En general, la síntesis proteica de las células neuronales parece ser más vulnerable a un suplemento inadecuado de aminoácidos durante la fase de mayor crecimiento cerebral, momento en el que el anabolismo proteico y por tanto, los requerimientos de aminoácidos, son muy altos (HUETHER, 1989; CHEREL y col., 1991). En ratas, el cerebelo es la región cerebral de más rápido crecimiento. Entre los días 5 y 15 después del parto, una proliferación masiva de neuroblastos en la capa

granular externa genera todas las células granulares que se sitúan en la capa granular interna. El crecimiento del axon es otro proceso que requiere un alto anabolismo proteico (HUETHER, 1989).

En definitiva, se puede concluir que ante un estado de malnutrición o ayuno a corto plazo, la síntesis proteica cerebral apenas es afectada, mientras que si se mantiene la situación durante un periodo más largo, la síntesis proteica cerebral disminuye, aunque no lo haga tan rápidamente como en el resto de los tejidos corporales. Por otro lado, tiene importancia la edad del animal en cuanto a los efectos que va a sufrir. En el cerebro de ratas en desarrollo, la malnutrición induce una disminución de la síntesis proteica, y una disminución en el transporte y utilización de aminoácidos. El cerebro de ratas maduras ahorra las proteínas ante una malnutrición proteica o ayuno, de manera que el turnover de proteínas rápidamente se hace más lento. Bajo estas condiciones, se piensa que una disminución de la síntesis proteica cerebral se debe a la tendencia que presentan los ribosomas a disminuir su actividad (CHEREL y col., 1991).

2.3.3.2.- Consecuencias de una disponibilidad de aminoácidos inadecuada sobre la síntesis de neurotransmisores y desarrollo cerebral

Muchos desequilibrios de aminoácidos pueden afectar al anabolismo proteico y desarrollo cerebral. Cada uno de los neurotransmisores parece jugar un papel diferente en el mantenimiento de las funciones bioquímicas, fisiológicas y de comportamiento cerebral.

La mayoría de los neurotransmisores son sintetizados en las células nerviosas a partir de sus precursores capturados del fluido extracelular.

La síntesis de, al menos, triptófano, tirosina, valina, histidina y treonina está influida por la disponibilidad de sus precursores en la dieta. Otros aminoácidos que funcionan como neurotransmisores- tales como GABA y aminoácidos ácidos (glutamato y aspartato)- no son esenciales en la dieta, su producción y liberación son reguladas dentro de la neurona (WURTMAN y FERNSTRON, 1975).

Varios son los estudios que apoyan la idea de que la biodisponibilidad de aminoácidos puede influir en la regulación del desarrollo por otros mecanismos, por ej., mediante el control de precursores de importantes mediadores intracelulares. Entre otros, los neurotransmisores, como la serotonina y las catecolaminas. La interacción de esos transmisores con sus receptores afecta a la morfogénesis del embrión, incluyendo en ello la división celular y la síntesis proteica (HUETHER, 1989).

Muchos investigadores han propuesto que esas monoaminas pueden tener función trófica antes de actuar como neurotransmisores en la sinapsis (GUSTAFSON y TONEY, 1970; BUZNIKOW y SHMUKLER, 1980; LAUDER, 1985a,b). Un buen ejemplo de ello es la serotonina (HUETHER y REIMER, 1987). Específicamente durante la neurogénesis y el desarrollo cerebral, las monoaminas intervienen, en parte, en la regulación de, por ejemplo, el cierre del tubo neuronal, la diferenciación de neuronas y de células gliales, la migración celular, los procesos de crecimiento y la sinaptogénesis (LAUDER y col., 1982; HAYDON y col., 1984; LAUDER, 1985a,b; CHUBAKOV y col., 1986).

La alteración que normalmente se da en la biodisponibilidad del triptófano durante la embriogénesis y desarrollo cerebral puede que sea parte del mecanismo de control para mantener una cantidad apropiada de aminas sintetizadas y liberadas a la edad de desarrollo apropiada y por la población celular adecuada.

Una alteración de la biodisponibilidad de esos precursores interferiría con sus patrones normales, y podría afectar al desarrollo normal. No se duda que la formación de serotonina depende de la biodisponibilidad de triptófano, no sólo en el cerebro adulto, sino también en el cerebro en desarrollo.

Concluyendo, es posible que variaciones en la disponibilidad de aminoácidos durante la ontogénesis influyan y modifiquen los procesos de metabolismo y maduración fenotípica (HUETHER, 1989).

2.3.4.- Aminoácidos azufrados en el desarrollo cerebral

La metionina es un aminoácido esencial para los mamíferos, incluido el hombre (ROSE y col., 1955; YAMAGUCHI, 1990), y muchos de sus metabolitos tienen un importante papel en el desarrollo. La cist(e)ina no es esencial para mamíferos adultos, aunque puede ahorrar hasta un 90% de los requerimientos dietarios de metionina (ROSE y WIXON, 1955). La biosíntesis de cist(e)ina durante el desarrollo de tejidos es limitada o nula (STURMAN y col., 1970; GAULL y col., 1972; ZLOTKIN y ANDERSON, 1982), sin embargo, ello sugiere que la cist(e)ina dietaria pueda ser necesaria durante el desarrollo. En este sentido, las proteínas de la leche humana contienen un 50% más de cist(e)ina que de metionina y además es una fuente nutricional excelente (GAULL y col., 1982). La cisteína es un aminoácido importante y esencial en las proteínas en virtud de su grupo sulfhidrilo, el cual es responsable de la configuración de la molécula, formada por un disulfuro unido a otra molécula de cisteína en la misma proteína y por unión del disulfuro a moléculas de cisteína en proteínas separadas y polipeptidos (STURMAN, 1987; YAMAGUCHI, 1990).

La concentración de cisteína en el plasma del feto es dos a tres veces superior a la del plasma de la madre (GAULL y col., 1973). Este control sobre la producción y acumulación de cisteína durante el desarrollo de los tejidos debe ser necesario por su toxicidad sobre el tejido nervioso en desarrollo (OLNEY y HO, 1970).

El precursor de la cisteína, la cistationina, se encuentra en alta concentración en el cerebro, especialmente en cerebro de primates y hombre. La concentración de cistationina durante el desarrollo cerebral es más baja y va aumentando en este periodo hasta conseguir el nivel adulto. Ello hace pensar que su función, aún desconocida, puede que se lleve a cabo en el cerebro maduro (TALLAN y col., 1983).

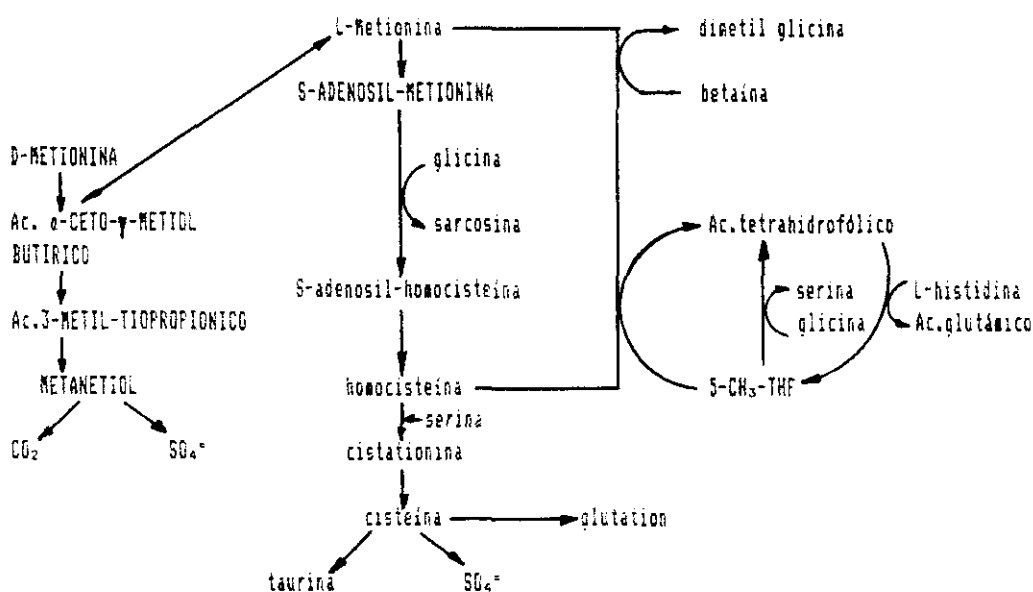
El último metabolito del metabolismo de la metionina, es la taurina (KOHASHI y col., 1978). Ha sido muy estudiado durante la última década. Su importancia radica en el importante papel que tiene en tejidos excitables como el cerebro, retina y corazón, y su posible importancia como nutriente, especialmente durante el desarrollo (STURMAN, 1987).

La taurina se conjuga con los ácidos biliares. Posee fuerte acción inhibitoria sobre las neuronas de la médula espinal y se la considera un estabilizador de la excitabilidad de la membrana neuronal.

La taurina es uno de los aminoácidos libres mas ubicuos y abundantes en los tejidos de mamíferos y especialmente está presente en alta concentración en el cerebro durante el desarrollo. La concentración de taurina en el cerebro disminuye progresivamente desde el nacimiento hasta la madurez. Comienza dicha disminución alrededor de la época del destete. Un avance importante en la investigación de la taurina fué el descubrimiento de que una dieta con deficiencia de taurina, administrada a gatos, hacía descender el nivel del aminoácido y producía degeneración de la retina (HAYES y col., 1975).

Sucede, al menos en gatos de corta edad, que la taurina tiene gran importancia en el desarrollo cerebral y su deficiencia produce anomalías neuronales (STURMAN, 1987).

Aunque parte de la taurina procede de los alimentos, sólo un 1% de esta llega al cerebro, por lo que las necesidades de dicho órgano en este aminoácido están cubiertas realmente por su síntesis a partir de metionina y en menor proporción de cist(e)ina.



* ESQUEMA DEL METABOLISMO DE LA METIONINA

El glutathion es un tripéptido con residuos de cisteína en su molécula, por lo que su contenido a nivel hepático en la rata fluctúa en función del nivel de aminoácidos azufrados en la dieta (TATEISHI y col., 1977), sin embargo, WALTON y col. (1982) y YOKOYAMA y NAKAZOE (1991), no piensan que haya esta dependencia de la dieta cuando estudian truchas tipo arcoiris.

2.3.5.- Influencia de la dieta sobre la función cerebral

Los trabajos pioneros de los 20 últimos años, particularmente los realizados en el Massachusetts Institute of Technology, han cambiado la concepción del cerebro como un órgano autónomo metabolizante. Estudios realizados sobre animales de laboratorio señalan que la formación de ciertos neurotransmisores cerebrales es influida no sólo por la ingesta oral de sus respectivos precursores, sino también por la ingesta nutricional. Particular interés tiene el efecto de los nutrientes sobre la serotonina cerebral. Otros estudios básicos han encontrado que la formación de noradrenalina cerebral está determinada por la concentración de tirosina en dicho tejido (MOLLER, 1986). Estos y otros detalles al respecto ya han sido comentados en este trabajo.

El cerebro está formado por dos tipos de células, neuronas y glía. Las primeras están implicadas en la conducción del impulso nervioso y en el control y coordinación del sistema corporal. Las células gliales son responsables de la estructura y formación de mielina.

Los sustratos metabólicos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de la actividad del SNC derivan de la dieta y cualquier deficiencia o alteración en el suministro de nutrientes va a influir en el metabolismo y función cerebral. Los efectos de la dieta sobre el cerebro son más conocidos a nivel neuronal que en las células gliales. Cualquier deficiencia nutricional afectará al crecimiento y desarrollo de las células cerebrales.

Las grasas alteran la composición de la membrana neuronal, lo cual influye en la función de estas células modificándola por diversos mecanismos (GREENWOOD y CRAIG, 1987).

Son importantes las vitaminas y los minerales, pues sirven como cofactores esenciales para las enzimas que sintetizan neurotransmisores.

Su papel metabólico en la mayoría de los tipos celulares del cuerpo ha sido bien descrito. Sin embargo, no sucede lo mismo en las células nerviosas y particularmente en el proceso de neurotransmisión.

De las vitaminas liposolubles, la **A** y la **E** están directamente implicadas en el metabolismo neuronal, sin embargo, la **D** influye indirectamente, al ejercer su efecto sobre el metabolismo del calcio (GREENWOOD y CRAIG, 1987). La vitamina **A** tiene un papel esencial en el proceso visual de la retina (KANEKO, 1979), mientras que la **E**, probablemente, funciona como un antioxidante en el cerebro, así como en otros tejidos (DREYFUS y GEEL, 1981). En general, las vitaminas hidrosolubles tienen las mismas funciones en las reacciones metabólicas de las células nerviosas que en las células de otros tejidos. Por ej., la vitamina **B₁₂** y el fosfato actúa en reacciones de transmetilación y en la síntesis de DNA (GANDY y col., 1973; DREYFUS y GEEL, 1981). La tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina y biotina participan como coenzimas en el metabolismo de carbohidratos, grasas y aminoácidos (DAKSHINAMURTI, 1977; DREYFUS y GEEL, 1981). El ácido ascórbico interviene en reacciones de hidroxilación en el cerebro, igual que en otros tejidos (SOURKES, 1979). Parece, por tanto, lógico pensar que una dieta inadecuada en vitaminas alteraría el metabolismo cerebral. Sin embargo, como en estas condiciones se afectaría la transmisión neuroquímica, no se conoce perfectamente. La tiamina, piridoxina y el ácido ascórbico intervienen en el control de la neurotransmisión (GREENWOOD y CRAIG, 1987). La deficiencia de tiamina hace que disminuyan los neurotransmisores comunes, glutamato y aspartato, posiblemente porque disminuye la entrada de piruvato al ciclo de Krebs (HAMEL y col., 1979).

También se ha postulado que la tiamina tiene un efecto directo sobre la conducción nerviosa a través de la tiamina pirofosfato (DAKSHINAMURTI, 1977). Además de la tiamina se requieren para la síntesis de neurotransmisores el ácido ascórbico y el piridoxal fosfato (**B₆**). El ácido ascórbico que se encuentra en concentración relativamente alta en el cerebro, interviene en la conversión de dopamina a norepinefrina por enzimas con cobre, dopamina β -hidroxilasa (SOURKES, 1979). El piridoxal fosfato hace de coenzima para la descarboxilación

de aminoácidos aromáticos (aminoácido descarboxilasa). Este enzima convierte dihidroxifenilalanina en dopamina y 5-hidroxitriptófano en serotonina, pero su papel no es idéntico en ambos casos. Es decir, la deficiencia de piridoxal fosfato en ratas jóvenes produce una deficiencia selectiva en la serotonina cerebral, pero no en dopamina o norepinefrina (DAKSHINAMURTI, 1982). Además, la síntesis de esas dos monoaminas por descarboxilación, es regulada separadamente (SIOW y DAKSHINAMURTI, 1985), y estos autores piensan que el piridoxal fosfato puede estar más estrechamente ligado a la dihidroxifenilalanina descarboxilasa que a la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa.

El papel del folato y la vitamina B₁₂ en el mantenimiento de la actividad transmitilante del SNC no es bien conocido. Sin embargo, la deficiencia en cada una de esas vitaminas puede afectar a la función del SNC. Por ej., el folato es requerido como coenzima para la síntesis y degradación del neurotransmisor inhibidor glicina.

Además, el 5-metil-tetrahidrofolato sirve como donador de metilos para la homocisteína (SPECTOR y col., 1980) y puede contribuir al mantenimiento de un adecuado nivel cerebral de S-adenosil-metionina (SAM). El SAM es el *principal donador de metilos en muchas reacciones cerebrales que incluyen aminos, neurotransmisores, proteínas, nucleoproteínas y fosfolípidos de membrana.*

Muchos minerales también son importantes en la función nerviosa, pero hay incluso menos información que de vitaminas, en cuanto a la influencia de sus variaciones en la dieta sobre los neurotransmisores.

El calcio es bien conocido que interviene en la conducción nerviosa como estímulo inmediato en la despolarización que se produce para la conducción del impulso nervioso (GREENWOOD y CRAIG, 1987).

Trazas de hierro, cobre y zinc influyen en el metabolismo de neurotransmisores, pero el mecanismo de este efecto es desconocido. Por ejemplo, el hierro puede ser un cofactor para la tirosina hidrolasa (MANDELL, 1978), así como para la monoamina oxidasa (MAO) (YODIN y col., 1980). Ratas jóvenes con deficiencia de cobre tienen disminuida la capacidad cerebral de tirosina hidrolasa (MORGAN y O'DELL, 1977). El zinc también influye sobre las

catecolaminas, aumentando su concentración en ratas jóvenes deficientes por mecanismos desconocidos (WALLWORK y col., 1982; HALAS y col., 1982). Además, el zinc puede tener otras funciones en el SNC. PFEIFFER y BRAVERMAN (1982) sugieren que el zinc puede ser necesario para el almacen de histamina, transporte axonal, microtúbulo neuronal y síntesis de tubulina y ensamblaje, y estabilidad estructural del factor de crecimiento nervioso. El zinc también parece jugar un papel importante en el mantenimiento de la función hipotalámica pituitaria (PFEIFFER y BRAVERMAN, 1982). Por tanto, podemos decir en general que el zinc (junto con la taurina) es de gran importancia en el desarrollo cerebral, así como para mantener la integridad morfológica y fisiológica de la retina de los vertebrados. El feto se provee de ambos nutrientes a partir de la madre y el recién nacido mediante la leche (PASANTES-MORALES y col., 1987).

En toda esta incertidumbre de vitaminas y minerales en el metabolismo de neurotransmisores, no se sabe si el cerebro tiene algún mecanismo de protección que le haga recurrir a otros tejidos, en caso de alguna deficiencia (GREENWOOD y CRAIG, 1987). Se sabe que el nivel de folato en el cerebro y en el fluido cerebro espinal es más alto que en suero, incluso durante periodos de deficiencia de folato (KOREVAAR y col., 1973). Durante la deficiencia de hierro, la actividad de la MAO cerebral sólo disminuye un 15%, mientras que en el corazón la caída es de un 60% o más, lo cual hace pensar en la existencia de un mecanismo de protección cerebral (YOU DIN y col., 1980).

WURTMAN y col. (1981) resumen en su trabajo que los nutrientes influyen sobre la síntesis y liberación de neurotransmisores cerebrales específicos por servir como precursores de estos y porque alteran la biodisponibilidad de esos precursores para el cerebro. Así, el consumo de una dieta rica en carbohidratos facilita la captura de triptófano por el cerebro y mediante la acción de la insulina se disminuyen los niveles plasmáticos de AANL. Alimentos ricos en leucina, como el huevo, elevan la colina plasmática y por tanto aumentan la síntesis de acetil colina neuronal.

Una dieta alta en proteínas aumenta de forma selectiva los niveles plasmáticos de AANL y disminuye el triptófano cerebral, de lo que se deduce un descenso de la relación plasmática triptófano/AANL (WURTMAN y col., 1981).

En estas condiciones también se produce un aumento de la relación plasmática tirosina/AANL y de la tirosina cerebral, facilitándose la síntesis de catecolaminas cerebrales (GLAESE y col., 1983; LIEBERMAN, 1986).

PETERS y HARPER (1987) en sus experimentos con ratas observan que modificaciones de aminoácidos en la dieta inducen cambios selectivos en los patrones de aminoácidos cerebrales. Ellos administran una comida única de una dieta baja en proteínas y con un aminoácido en exceso, que puede ser de cadena larga, neutro o indispensable y detectan una disminución en el contenido cerebral de AANL (metionina, lisina, fenilalanina, triptófano e histidina) y aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina, valina). De forma similar PENG y col. (1973) ya habían visto con anterioridad que el contenido de arginina cerebral disminuye selectivamente cuando las ratas reciben un exceso de lisina. Este mismo autor un año antes (1972) alimentó a ratas con dietas bajas en proteínas, limitadas en histidina y conteniendo sólo cantidades adicionales de aminoácidos esenciales. Observa que hay un aumento de la concentración plasmática de los aminoácidos esenciales adicionados a la dieta y una marcada disminución de la histidina en el cerebro. Este efecto LUTZ y col. (1975) piensan que es debido a la competición entre los AANL adicionados y la histidina por el transporte a través de la BHE.

Poco tiempo después, otros trabajos han demostrado que los aminoácidos no esenciales y AAN pequeños (serina, alanina y α -ABA) son competidores efectivos de la treonina (disminuye cuando a la dieta se la adiciona dichos aminoácidos) para el transporte a través de la BHE (TEWS y col., 1978, 1980, 1981; MERCER y col., 1989).

Análogos de AANL o aminoácidos básicos compiten por su transporte a través de la BHE con aminoácidos como alanina y lisina, respectivamente, haciendo descender las concentraciones de estos últimos (TEWS y col., 1980, 1981; TEWS y HARPER, 1983; MERCER y col., 1989).

2.4.- MALNUTRICION PROTEICO-ENERGETICA

2.4.1.- Generalidades

Es CICELY WILLIAMS (1933) quien introduce en la medicina moderna el término Kwashiorkor y lo relaciona con la dieta. En 1959, JELLIFFE comienza a hablar de Malnutrición Proteico-Energética (MPE). En 1973, la FAO y WHO definen la MPE como una variación de las condiciones patológicas provenientes de la carencia, en proporciones variadas, de proteínas y calorías, ocurriendo con mayor frecuencia en bebés y niños jóvenes, y comunmente asociada con infecciones.

La importancia de la malnutrición como parámetro de desarrollo económico y social y como factor condicionante en muchas enfermedades ha sido muy estudiada por la OMS (1976) (OLOWOOKERE, 1987).

Es bien sabido que la MPE presenta una gran incidencia en zonas tropicales de Africa, Asia y América latina (ROGERS, 1959) y que los niños menores de 5 años son particularmente sensibles a los efectos de la malnutrición por sus especiales requerimientos nutricionales.

Pero la edad no inmuniza, aunque en personas mayores la enfermedad es mucho menos frecuente y las manifestaciones clínicas no son tan obvias y abundantes. Ello se debe a que el adulto no necesita proteínas para crecer y las proteínas de las dietas para adultos proporcionan el 10% de la energía (GURNEY, 1979).

Es una enfermedad principalmente de áreas rurales y países en vías de desarrollo (OLOWOOKERE, 1987).

La patogénesis de la MPE ha sido muy estudiada por JOLIFFE y col. (1950), pero aún con mayor detalle lo hace Mc LAREN (1966). Este último autor demuestra que el Marasmo ocurre principalmente en niños menores de un año y más frecuentemente en grandes ciudades. El Kwashiorkor es más común en áreas rurales y con mayor frecuencia a partir del segundo año de vida. Coincide además con otros autores en pensar que estas dos formas de malnutrición son síndromes

extremos y entre ellos hay una serie de formas clínicas debidas a una variada combinación de deficiencias en proteínas y energía junto con deficit en vitaminas, minerales y a infecciones asociadas (OLOWOOKERE, 1987; COULTER y col., 1988).

Desde el punto de vista clínico, el Kwashiorkor produce alteraciones mentales, pérdida de apetito y pelo, cambios en la piel, edema, hígado graso, puede existir pérdida de peso pero con mantenimiento de la grasa e insuficiente crecimiento. Los niños con Marasmo son de ojos brillantes, con un buen apetito, detención del crecimiento, pérdida del tejido adiposo y consumo generalizado de la masa corporal magra y sin edema. La forma mixta de MPE incluye retardo en el crecimiento, circunferencia craneal disminuida y crecimiento de los huesos insuficiente, gran desgaste muscular y frecuentes infecciones, especialmente diarreicas (COULTER y col., 1988; MERCER y col., 1989), así como alteraciones mentales dependiendo de la edad (CARMONA DA MOTA y col., 1990).

La deficiencia energética dietaria disminuye la energía gastada en actividad. El nivel de actividad no es usado como un indicador clínico objetivo de la MPE. Sin embargo, niños que toman dietas deficitarias de energía son menos activos que los que toman una cantidad adecuada de energía. Con una dieta carente en proteínas y energía, una segunda adaptación, aparte de lo que sucede con la actividad, es la disminución del crecimiento. Cuanto mayor sea el desequilibrio proteico energético, mayor será el descenso del crecimiento. En una MPE ligera no existe o, al menos, son poco apreciables tanto la disminución de la actividad y crecimiento, como los cambios bioquímicos internos. Cuando ésta MPE es más severa es cuando se comienza a detectar (GURNEY, 1979).

Lógicamente, los casos extremos de malnutrición se ven relacionados con la muerte. VELLAS y col. (1990) hacen su estudio en ancianos y ven que la posibilidad de muerte aumenta con la malnutrición. Observan en dichos individuos una reducción en las proteínas y no encuentran diferencias significativas en el nivel de vitaminas.

BIOQUIMICA Y DESORDENES METABOLICOS DURANTE LA MPE:

Durante la MPE, el metabolismo general se reduce pero, probablemente, no mucho más que la masa celular.

Así, se observa en cuanto al metabolismo de proteínas, que la relación aminoácidos no esenciales/aminoácidos esenciales del suero puede aumentar en una deficiencia proteica temprana antes de que hayan variado otros signos físicos como el crecimiento. Este signo no es constante y puede ser modificado en presencia de una deficiencia energética asociada. Ello es de poco valor en un niño en particular, pero a nivel colectivo puede ayudar a identificar la carencia energética y proteica en las dietas (GURNEY, 1979).

Las concentraciones plasmáticas de aminoácidos esenciales, especialmente las de aminoácidos de cadena ramificada y la tirosina, son bajas, pero algunos aminoácidos no esenciales pueden aparecer con concentraciones más altas de lo normal (PASSMORE e EASTWOOD, 1986).

La concentración de albúmina plasmática desciende (OLOWOOKERE, 1987), debido a una disminución de su síntesis en el hígado. Ello es, en parte, responsable del edema (PASSMORE e EASTWOOD, 1986). WHITEHEAD (1977) y HAY y WHITEHEAD (1975) piensan que el nivel de albúmina es uno de los indicadores bioquímicos más útiles en MPE.

La Ig G normalmente está aumentada, debido a la infección. El resto de las Ig suelen tener niveles normales (PASSMORE e EASTWOOD, 1986).

BASSIR (1959), sugiere que la disminución de la relación albúmina/globulinas es uno de los indicadores más precoces en la MPE. INGELBLEEK y col. (1972, 1975) han demostrado que la transferrina plasmática, el retinol ligado a las proteínas plasmáticas y la prealbúmina son también indicadores muy sensibles a la MPE.

La concentración de algunas enzimas plasmáticas son reducidas, reflejando su deplección a los tejidos y órganos. Se han encontrado bajos valores en colinesterasa, fosfatasa alcalina, amilasa y lipasa.

La urea sanguínea está disminuída normalmente y puede llegar a 1 mmol/l (6 mg/100 ml). Ello refleja una reducción en la ingesta proteica y una disminución en el catabolismo de proteínas.

En el caso de ser las calorías el factor limitante en la dieta, la producción de urea por el contrario, se incrementa, debido a la elevación del catabolismo proteico muscular (REDDY y col., 1975).

La creatinina urinaria es también reducida, reflejando una disminución de la masa muscular (PASSMORE y EASTWOOD, 1986).

En lo que se refiere al metabolismo lipídico, ya desde 1963, con Mc DONALD y col., se observa la importancia del hígado graso en MPE. Un hígado graso es característico en el kwashiorkor, pero anormal en el Marasmo (PASSMORE y EASTWOOD, 1986).

Del metabolismo de hidratos de carbono hay que comentar que el individuo con MPE tiende a mantener el nivel de glucosa sanguínea, sin embargo, puede ocurrir una hipoglucemia. La tolerancia a la glucosa, generalmente, también es normal aunque a veces puede ser disminuída.

Con MPE el agua corporal aumenta. En niños con Marasmo en los que la grasa está muy disminuída, se producen valores muy altos de agua, principalmente en el agua extracelular, aunque las células también son sobrehidratadas.

Es también frecuente encontrar deficiencia en folato, retinol, hierro (anemia hipocrómica), magnesio y potasio.

Por cuanto respecta a órganos y sistemas corporales también se producen una serie de cambios ante una MPE. Las células pancreáticas y de la mucosa intestinal se atrofian, ello hace que no se puedan producir enzimas digestivas en cantidades normales y que no se puedan absorber bien los nutrientes. No hay evidencia de la hipofunción de las glándulas endocrinas. La concentración de la hormona de crecimiento en el plasma puede aumentar en el kwashiorkor.

Muchos de los desequilibrios encontrados en el metabolismo, pueden ser explicados por la alta concentración de cortisol circulante.

Ha sido descrita una inadecuada secreción de insulina después de hacer la prueba de la tolerancia a la glucosa (PASSMORE y EASTWOOD, 1986). La disminución de la relación insulina/cortisol en el plasma, es un cambio adaptativo a la desnutrición crónica y está fuertemente relacionado con un retardo en el crecimiento (COWARD y LUNN, 1981).

Puede encontrarse una suave albuminuria, pero esto no es signo de una *anomalía funcional del riñón*. La filtración glomerular puede ser, ciertamente, baja, pero ello es debido, probablemente, a la deshidratación o a la disminución del ritmo cardíaco (PASSMORE y EASTWOOD, 1986).

Algunos autores han descrito una adaptación renal, con aumento de taurina en una deficiencia de aminoácidos azufrados, pero el mecanismo por el que se produce no es bien conocido (CHESNEY, 1985).

La restricción de la proteína dietaria en la madre afecta al feto en desarrollo y esas alteraciones persisten en el adulto (WINICK y VELASCO, 1969).

Aparte de las medidas bioquímicas, las medidas antropométricas en MPE, pueden ser de gran importancia (GURNEY, 1979).

2.4.2.- Malnutrición proteica en el cerebro

Los efectos de la privación proteica sobre la síntesis de proteínas han sido estudiados con detalle (GARLICK y col., 1975). La malnutrición, al igual que produce cambios en el desarrollo mental, puede inducir variaciones en la síntesis y en el catabolismo (CONDE y SCORNIK, 1977). Se produce una inhibición regional del crecimiento cerebral (FISH y WINICK, 1969a) y una disminución en el número de células (ZAMENHOF y col., 1971), en la formación de células (PATEL y col., 1973), en el contenido de ácidos nucleicos (GRIFFIN y col., 1977), y en la mielinización (KRIGMAN y HOGAN, 1976). El nivel de aminoácidos libres es también alterado (MOUREK y col., 1970), así como su distribución (PATEL y col., 1975b) y su utilización (MILLER y col., 1977). Los

efectos sobre las proteínas son desiguales, pero esto no ha sido estudiado con detalle. La cantidad de algunas enzimas sintetizadoras de transmisores disminuye (ECKHERT y col., 1976; PATEL y col., 1978) y la proteína s-100 también es disminuída selectivamente en áreas específicas (MOORE y col., 1977).

LAJTHA y col. (1987) y CARMONA DA MOTA y col. (1990) encuentran que los cambios a nivel cerebral en el adulto son pequeños, incluso después de un ayuno drástico. Los cambios en el cerebro en desarrollo son significativos y si persiste la malnutrición, pueden llegar a ser permanentes.

La diferencia más importante entre el cerebro y otros órganos es que en el cerebro, la malnutrición inhibe el catabolismo proteico así como la pérdida de proteínas (BANAY-SCHWARTZ y col., 1979).

Los efectos pueden ser distintos en cerebro que en músculo y no todas las proteínas se afectan de igual modo. El ayuno inicialmente disminuye y mas tarde aumenta la proteólisis muscular, afectando al nivel de catepsina D y al nivel de inhibidores endógenos (GOODMAN y col., 1981; SAMAREL y col., 1981). El efecto depende, en parte, del estado nutricional anterior del individuo y de la edad (LAJTHA y col., 1987). La relativa estabilidad del metabolismo de proteínas cerebrales comparado con otros tejidos ha sido bien observada (GOODMAN y col., 1984). La malnutrición durante el periodo de lactación afecta a la proteína sináptica cualitativa y cuantitativamente (SMITH y DRUSE, 1982). Los cambios en el metabolismo de proteína miélnica durante la malnutrición son mucho mayores que en otras proteínas (WIGGINS y col., 1974). Esos cambios proteicos son diferentes en los diferentes tejidos, no habiendo cambios en el turnover proteico durante el envejecimiento en el hígado (GOLDSPINK y KELLY, 1984), pero, sin embargo, disminuye el turnover en el músculo (LEWIS y col., 1984) y en el cerebro (FRANDO y col., 1980; LAJTHA y DUNLOP, 1981).

En la malnutrición proteica se produce una reducción de la concentración de insulina (ANTHONY y FALOONA, 1974) y ello podría hacer variar la biodisponibilidad de aminoácidos precursores (JUORIO, 1987).

La disminución de la ingesta de ratas alimentadas con una dieta libre

o baja en proteínas está asociada con una disminución en plasma (PENG y col., 1969, 1974) y cerebro (PENG y col., 1974; PETERS, 1983; GLAESER y col., 1983) de la mayoría de los aminoácidos esenciales.

La disminución en la tasa de metabolismo proteico corporal total durante una malnutrición proteica, viene determinada por cambios metabólicos en cada tejido, individualmente considerados. En esas condiciones, el cerebro aumenta de tamaño (GARROW y col., 1965) en relación al músculo, el cual se reduce (STANDARD y col., 1959) y la proteína dietaria puede variar en cualquier dirección.

En el kwashiorkor, así como todos los aminoácidos esenciales están disminuídos, la histidina como excepción, está aumentada. Así, la relación sérica aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales se encuentra más baja de lo normal y la histidina/AANL está más alta.

La elevación en suero y cerebro de la histidina en una deficiencia proteica ha sido demostrada por muchos laboratorios. No se conoce exactamente la procedencia de esta histidina, pero se pueden aceptar como importantes fuentes el catabolismo de la carnosina (β -alanil-histidina), el aumento del catabolismo proteico, especialmente de la hemoglobina, y la disminución del catabolismo de la propia histidina.

2.4.3.- Manutrición proteico-energética en el cerebro

La MPE se caracteriza por una gran variedad de síntomas neurológicos. Durante el periodo crítico de desarrollo, causa una deficiencia irreversible en el crecimiento (CARMONA DA MOTA y col., 1990). En este sentido, RANA y MEHTA (1991) observan una disminución en el peso corporal de monos con MPE sufrida durante el desarrollo postnatal. Incluso puede llegar a tener su efecto sobre el desarrollo mental del individuo (CARMONA DA MOTA y col., 1990; GRANTHAM-McGREGOR y col., 1991).

En un estudio llevado a cabo por PORTMAN y col. (1977), se aprecia una reducción significativa del peso cerebral de monos Rhesus sometidos a malnutrición. Sin embargo, CHEEK y col. (1976) y MEHTA y col. (1981), no detectan variaciones significativas del peso cerebral bajo estas condiciones. Aunque

otros autores (HOWARD y BUJNOVSZKY, 1965; GRIFFIN y col., 1977; FREEDMAN y col., 1980), señalan en el cerebro de ratas malnutridas una disminución de peso y del contenido de proteínas y ácidos nucleicos. Este descenso del contenido proteico cerebral se debe, según BANAY-SCHWARTZ y col. (1979), a una síntesis proteica menos activa. Del mismo modo, MEHTA y col. (1981), mediante análisis bioquímicos, hallan un contenido de RNA por debajo de lo normal y de igual forma sucede con el DNA (PASSMORE y EASTWOOD, 1986).

Un descenso en el nivel de lípidos cerebrales y mielina es apreciado por PORTMAN y col. (1977) en trabajos con monos malnutridos durante la época prenatal y postnatal temprana y por PASSMORE y EASTWOOD (1986). A diferencia de estos autores, CHEEK y col. (1976) y MEHTA y col. (1981), no ven un efecto significativo sobre los lípidos y proteínas cerebrales de monos con MPE.

Autores como WIGGINS y col. (1979), han dedicado su trabajo al estudio de la síntesis de mielina mediante glucosa marcada (glucosa-U-C¹⁴) en ratas malnutridas.

La utilización de un exceso de glucosa por monos Rhesus sometidos a MPE ha sido investigada recientemente por RANA y MEHTA (1991). Ellos observan que cuando a estos animales se les administra glucosa-U-C¹⁴, se produce un aumento de la captura de glucosa por el tejido cerebral, pero este exceso de hidrocarbonado no será invertido en la síntesis de mielina, lactato, piruvato o glucógeno, sino en la producción de gangliósidos cerebrales como medida de adaptación y en la síntesis en exceso de ácidos grasos libres para compensar el efecto que la malnutrición impuesta ejerce sobre la membrana plasmática sináptica y así mantener esta. Por otro lado, observan que debido a la MPE puede producirse una degeneración de mielina cerebral que hace que parte de la glucosa administrada haga aumentar el colesterol esterificado y disminuir el colesterol libre.

La malnutrición puede afectar a la concentración de neurotransmisores en el cerebro. Además, la cantidad y calidad de malnutrición en ratas, también puede conducir a concentraciones no fisiológicas de neurotransmisores durante la diferenciación cerebral, resultando efectos teratógenos (PASSMORE y EASTWOOD, 1986).

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1.1.- Estudio de la carencia de met + cis en la dieta

Se distribuyen los animales de experimentación según los lotes siguientes:

- LOTE I. CONTROL:

- . Dieta control balanceada (10% de proteína: caseína + DL-metionina 0.02%).
- . 26 ratas Wistar machos.
- . Peso inicial aproximado: 87 ± 6.9 g.
- . Duración del experimento: 20 días que se inician después de transcurridos 3 de adaptación a la dieta control.
- . Sacrificio de lotes de cuatro animales los días 4, 8, 14 y 20 del experimento.
- . Toma de muestras: cerebro, sangre en los días indicados y orina cada tres días.

- LOTE II. CARENTE EN MET + CIS:

- . Dieta carente en met + cis (10% de proteína: aminoácidos cristalinos con ausencia de met + cis).
- . 26 ratas Wistar machos.
- . Peso inicial aproximado: 87 ± 6.9 g.
- . Duración del experimento: 20 días después de 3 de adaptación con dieta control.
- . Sacrificio de lotes de cuatro animales los días 4, 8, 14 y 20 de la experiencia.
- . Toma de muestras: cerebro, sangre en los días indicados y orina cada tres días.

3.1.2.- Estudio de la carencia de met + cis en la dieta con restricción de la energía a la mitad

Se distribuyen los animales de experimentación según los lotes siguientes:

- LOTE I, CONTROL:

- . Dieta control balanceada (10% de proteína: caseína + DL-metionina 0.02%).
- . 26 ratas Wistar machos.
- . Peso inicial aproximado: 87 ± 6.9 g.
- . Duración del experimento: 20 días tras 3 de adaptación a la dieta control.
- . Sacrificio de cuatro animales los días 4, 8, 14 y 20 del experimento.
- . Toma de muestras: cerebro, sangre en los días indicados y orina cada tres días.

- LOTE III, CARENTE EN MET + CIS Y CON LA MITAD DE ENERGÍA:

- . Dieta carente de met+cis (20% de proteína: aminoácidos cristalinos carentes de met+cis con reajuste del resto de los nutrientes para que dicha dieta al ser administrada a la par con respecto a la II, con la mitad de lo ingerido en este caso, tenga la mitad de energía, y aminoácidos, minerales y vitaminas en concentración igual a la dieta II).
- . 20 ratas Wistar machos.
- . Peso inicial aproximado: 87 ± 6.9 g.
- . Duración del experimento: 14 días tras 3 de adaptación a la dieta control.
- . Sacrificio de cuatro animales los días 4, 8 y 14 del experimento (en realidad 5, 9 y 15 por el retraso que sufre este lote, por necesidades del diseño experimental, al ser administrada la dieta III a la par con respecto a la dieta II).

3.2.- DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

Se utilizan 72 ratas machos de la raza Wistar, procedentes del Departamento de Nutrición y Bromatología I de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Se trata de ratas machos en periodo de crecimiento a las que, después del destete, se alimenta con dietas stock de laboratorio, hasta alcanzar un peso aproximado de 87 ± 6.9 g.

Seguidamente, son distribuidas en jaulas individuales de metabolismo. A partir de ese momento, y después de tres días de adaptación durante los cuales se les administra la dieta control y agua "ad libitum", se inicia el periodo experimental.

Los animales son distribuidos en tres lotes, dos de 26 ratas y un tercero de 20 ratas, recibiendo dietas de composición diferente según el diseño experimental. Las dietas I y II se administran "ad libitum" y la dieta III a la par y con la mitad de la ingesta del segundo lote.

La dieta III tiene una composición semejante a la dieta II, pero ajustada de modo que al ser administrada a la mitad de la ingesta de la dieta II, proporcione la mitad de energía pero la misma cantidad del resto de los nutrientes. De este modo se produce retraso de un día en el desarrollo del experimento del lote III con respecto a los lotes I y II.

Durante los 20 días de la experiencia se mantiene a los animales a una temperatura ambiente de 23°C, humedad adecuada y ciclos de luz-oscuridad de 12h.

El agua se suministra "ad libitum" y diariamente se determina la ingesta, mientras que el peso corporal se controla cada tres días.

Se recogen además, la orina y las heces de tres días coincidiendo con el señalado para el sacrificio.

Ante los signos de deterioro que empiezan a manifestar los animales del lote III, llegando incluso a la muerte, se inicia un periodo de realimentación el día 8 (9 real) para este lote; y el día 14 para el lote II. Los resultados de este proceso, al carecerse de un número suficiente de individuos, se posponen para un estudio posterior.

En el presente estudio se sacrifican los animales los días 4, 8 y 14, entre las 9 y 12 h. a.m., extrayendo, previa anestesia con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso), el cerebro y la sangre, esta mediante canulación de la arteria carótida. De cada grupo se separa un grupo de animales que se destina a la valoración de la síntesis proteica y ganancia miofibrilar.

Se estudian los siguientes parámetros:

- Ingesta, peso corporal y balance de nitrógeno.
- En plasma : Proteínas totales y fracciones (albúmina, alfa, beta y gamma globulinas), colesterol, glucosa, insulina, urea y nitrógeno ureico.
- En orina : urea y creatinina.
- En cerebro se determina: peso del cerebro y peso del cerebro/peso corporal (índice cerebrosomático) y en homogenados de dicho órgano se determinan proteínas solubles, tasa de DNA y RNA, fracciones correspondientes al DNA (proteína/DNA, tamaño celular y número de nucleos), fracciones correspondientes al RNA (RNA/proteína, RNA/DNA), las actividades enzimáticas DNasa, RNasa, fosfatasas ácida y alcalina, beta glucuronidasa y las transaminasas, GOT y GPT.
- Aminoácidos libres en cerebro, plasma y glóbulos rojos, agrupados en:
 - . Aminoácidos totales (AAT)= AAE + AANE
 - . Aminoácidos esenciales (AAE)= Arg + His + Ile + Leu + Val + Trip + Phe + Met + Lys.
 - . Aminoácidos no esenciales (AANE)= Ala + Asp + Glu + Gln + Gly + Ser + Tyr
 - . Aminoácidos neutros= AAR + AAA
 - . Aminoácidos de cadena ramificada (AAR)= Ile + Leu + Val
 - . Aminoácidos aromáticos (AAA)= Phe + Tyr + Trip
 - . Aminoácidos gluconeogénicos = Asp + Glu + Ser + His + Gly + Ala + Glun + Aspn + Thr
 - . Aminoácidos azufrados = Met + Tau
 - . Aminoácidos básicos = Arg + Lys + His

3.2.1.- Composición de las dietas

3.2.1.1.- Dieta I ò control con 10% de proteina (Caseina+DL-metionina)

<u>Ingredientes (a)</u>	<u>g/Kg dieta (s.s.s.)</u>
Almidón	200.00
Sacarosa	534.60
Celulosa	55.40
Aceite de oliva	50.00
Mezcla mineral (b)	50.00
Mezcla vitamínica (b)	10.00
Caseína	98.00
Metionina	2.00

(a) Segùn HEGER y FRYDRYCH (1985).

(b) Según ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (1970),
la composición de la mezcla mineral es la siguiente:

	<u>g/Kg de mezcla mineral</u>
ClNa	139.300
IK	0.790
PO ₄ H ₂ K	389.000
SO ₄ Mg anhidro	57.300
CO ₃ Ca	381.400
SO ₄ Fe.7H ₂ O	27.000
SO ₄ Mn.H ₂ O	4.010
SO ₄ Zn.7H ₂ O	0.548
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0.477
Cl ₂ CO.6H ₂ O	0.023

La mezcla vitamínica es:

	<u>mg ó UI/Kg de dieta</u>
Vitamina A	20000 UI
Vitamina D	2000 UI
Vitamina E	100 UI
Menadiona	5 mg
Colina	2000 mg
PABA	100 mg
Inositol	100 mg
Niacina	40 mg
D-Pantotenato de Ca	40 mg
Riboflavina	8 mg
Tiamina ClH	5 mg
Piridoxina ClH	5 mg
Acido fólico	2 mg
Biotina	0.4 mg
Vitamina B ₁₂	0.03 mg
Glucosa	c.s.p. 10 g

Kcal/Kg de dieta* (s.s.s.) 3710

*Según COATES (1976).

3.2.1.2.- Dieta II con 10% de proteína (aminoácidos cristalinos exentos de met + cis)

<u>Ingredientes (a)</u>	<u>g/Kg dieta (s.s.s.)</u>
Almidón	200.0
Sacarosa	534.6
Celulosa	50.0
Aceite de oliva	50.0
Mezcla mineral (b)	50.0
Mezcla vitamínica (b)	10.0
Mezcla de aminoácidos (c)	105.4

(a) Según HEGER y FRYDRYCH (1985).

- (b) Según ASSOCIATION OF AGRICULTURAL CHEMISTS (1970).
Siendo la composición de las mezclas mineral y vitamínica la anteriormente detallada.
- (c) Según NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

La mezcla de aminoácidos esenciales se compone de :

	<u>g/Kg de dieta</u>
Clorhidrato de arginina	7.3
L-Histidina	3.0
L-Isoleucina	5.0
L-Leucina	7.5
Clorhidrato de L-Lisina	8.7
L-Fenilalanina	5.0
L-Tirosina	3.0
L-Treonina	5.0
L-triptófano	1.5
L-Valina	6.0

La mezcla de aminoácidos no esenciales es:

	<u>g/Kg de dieta</u>
L-Alanina	5.662
L-Asparagina	7.404
L-Glutamina	2.090
L-Acido aspártico	5.662
L-Acido glutámico	2.178
Glicina	23.085
Prolina	1.655
L-Serina	5.662

Kcal/Kg de dieta (s.s.s.) 3710

3.2.1.3.- Dieta III con 20% de proteína (aminoácidos cristalinos exentos de met+cis), doble cantidad de celulosa, mezcla mineral, vitamínica y aminoácidos que la dieta II. Con reajuste de las cantidades de almidón y sacarosa según (a)

<u>Ingredientes</u>	<u>g/Kg de dieta (s.s.s.)</u>
Almidón (a)	346.36
Sacarosa (a)	172.84
Celulosa	100.00

Aceite de oliva	50.00
Mezcla mineral (b)	100.00
Mezcla vitamínica (b)	20
Mezcla de aminoácidos (c)	210.80

(a) Segùn HAVERBERG y col. (1975).

(b) Segùn ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (1970).

(c) Segùn NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

La mezcla de aminoácidos se compone de:

<u>Aminoácidos esenciales</u>	<u>g/Kg de dieta</u>
ClH-Arginina	14.6
L-Histidina	6.0
L-Isoleucina	10.0
L-Leucina	15.0
Cl-Lisina	17.4
L-Fenilalanina	10.0
L-Tirosina	6.0
L-Treonina	10.0
L-Triptófano	3.0
L-Valina	6.0
<u>Aminoácidos no esenciales</u>	<u>g/Kg de dieta</u>
L-Alanina	11.324
L-Asparragina	14.808
L-Glutamina	4.180
L-Aspártico	11.324
Acido L-Glutámico	4.356
Glicina	46.170
Prolina	3.310
L-Serina	11.324

El control de la composición de las dietas se realiza por medio de las técnicas de rutina, determinando nitrógeno total (por el método de Kjeldahl), grasa (por el método de Soxhlet), humedad y cenizas.

Kcal/Kg de dieta (s.s.s.) = 3.521.

3.3.- DETERMINACIONES ANALITICAS

3.3.1.- Toma de muestras

3.3.1.1. Orina y Heces

La recogida de orina y heces de tres días consecutivos se realiza en jaulas individuales de metabolismo y de forma separada.

La orina es recogida en cápsulas "ad hoc" que contienen 5 ml de solución de timol al 5% en Isoproterenol y 10 ml de agua destilada, se lleva a matraces aforados de 250 ml y seguidamente, se enrasa con agua destilada que contiene un 1% de timol (p/v). Se toma un alícuota y se conserva a -20°C, hasta posterior análisis.

Así mismo, las heces de tres días se mantienen a -20°C protegidas con papel de aluminio, para evitar su desecación.

3.3.1.2. Sangre y Cerebro

Los animales se anestesian con una dosis de 30 mg de pentobarbital sódico/Kg de peso corporal, vía i.p. La solución de anestesia contiene:

Pentobarbital sódico	30 mg
Propilén glicol	200 ml
Etanol	100 ml
Agua destilada	c.s.p. 1000 ml

La sangre se obtiene mediante canulación de la arteria carótida y es recogida en tubos de hematocrito y de hemólisis heparinizados (4 mg de heparina / ml de sangre). Los tubos de hemólisis se centrifugan a 4500 r.p.m. durante 15 minutos, separando de esta manera el plasma de los eritrocitos y otros elementos formes.

El cerebro es extirpado e inmediatamente ultracongelado mediante inmersión en un vaso de Dewar que contiene nitrógeno líquido a una temperatura de -130°C.

3.3.2.- Preparación de las muestras

3.3.2.1.- Determinaciones enzimáticas y de proteínas

Se pesa una alícuota de tejido y se suspende en una solución tampón a 0°C, a pH 7.4, constituida por ClNa 0.1 M y CO₃HNa 0.005 M en una proporción del 20% (p/v). Posteriormente se homogeniza en homogenizador ultraturrax a 20.000 r.p.m durante 14 segundos. El homogenado se centrifuga a 550 G durante 15 minutos y el sobrenadante se pasa a otro tubo y se mantiene en baño de hielo para impedir las pérdidas enzimáticas. Partes alícuotas de éstos sobrenadantes se utilizan para las determinaciones analíticas.

3.3.2.2. Sangre

Se centrifuga a 4.500 r.p.m. (700 G) durante 15 minutos para separar el plasma de los glóbulos rojos.

El plasma se utiliza para la determinación de aminoácidos libres. Para ello, se trata con metanol (0.1 ml de plasma en 2 ml de metanol) precipitándose así las proteínas del plasma y disolviéndose los aminoácidos en el alcohol. Seguidamente se centrifuga a 700 G y se conserva el sobrenadante a -20°C. El resto del plasma se conserva para otras determinaciones.

A los glóbulos rojos se les añade también metanol, en la proporción 0.1 ml de glóbulos rojos /2 ml de metanol, se sonicán para hemolizarles y se centrifugan a 700 G. En el sobrenadante se determinan los aminoácidos libres.

3.3.3.- Sistema cromatográfico (HPLC)

El Sistema Cromatográfico (HPLC), está constituido por los siguientes elementos:

- 1.- Depósito de disolvente: Se emplean dos botellas de plástico de 5 l de capacidad donde están los disolventes A y B, que constituyen la fase móvil del sistema.
- 2.- Bombas de alta precisión: Se utilizan dos bombas de la casa Waters, modelo 6000 A con estructura electrónica descrita en los manuales de instrucciones correspondientes.

Son bombas hidráulicas que impulsan el disolvente a una presión y flujo constantes y son reguladas por un gradiente lineal.

3.- Inyectador automático: El modelo empleado es el Wisp 710 B de la casa Waters. La descripción de su mecánica y estructura electrónica se recoge en el manual correspondiente.

Consta de un manómetro que regula la presión del sistema a P.S.I., con objeto de captar un volumen adecuado de solución estándar, muestras y solución derivatizante.

Estos volúmenes son inyectados al principio de la columna mediante una jeringa regulada automáticamente. Se compone también de un sistema portador de muestras autorregulado, con 96 viales.

4.- Columna: Se utiliza el modelo R 1362 Hypersil ODS 5 micras, de acero inoxidable, con dimensiones de 15 x 0.4 cm, cuya misión es separar los distintos componentes de la muestra de aminoácidos según el coeficiente de partición entre el hidrocarburo de la columna y la mezcla de diluyentes.

5.- Detector: Es un espectrofluorímetro que mide la fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con la mezcla de ortoptyaldehído y 2-mercaptoetanol. Transmite automáticamente a la aguja inscriptora una señal proporcional a la concentración de dichos aminoácidos.

El detector de fluorescencia consta de dos partes:

- Unidad electrónica: Fluorescence Detector, modelo 420 E de la casa Waters.
- Unidad celular: Fluorescence Detector, modelo 420 C de la casa Waters.

El conjunto está formado por los siguientes elementos: Fuente de luz, filtros, célula de flujo, fotodetector, amplificador, lector y suministrador de energía. La detección por fluorescencia es una técnica cualitativa y cuantitativa en la cual se utilizan sustancias fluorescentes. Esa fluorescencia se consigue por derivatización con la mezcla OPA y 2-mercaptoetanol con los aminoácidos.

6.- Procesador de datos: El modelo utilizado es el "Data Module" de la casa Waters, el cual lleva un registrador termoelectrónico que inscribe las señales emitidas por el detector, traducidas electrónicamente y amplificadas. Dichas señales son inscritas en forma de picos cuyas áreas son proporcionales a la cantidad de aminoácido presente en la muestra. Estas áreas son calculadas por un integrador automático que, mediante un procesador matemático, cuantifica las áreas de los picos de los aminoácidos objeto de estudio.

7.- Controlador programable: Todos los aparatos descritos están conectados al sistema controlador programable, modelo 721 de Waters, que es un microprocesador capaz de controlar todas las funciones del cromatógrafo líquido de alta resolución, sistema HPLC.

3.3.4.- Técnicas empleadas

3.3.4.1.- Balance de Nitrógeno

Se utiliza el método Kjeldahl (A.O.A.C.,1975).

La riqueza en próticos se determina valorando el nitrógeno total y multiplicando por el factor 6.25. Para ello, se convierte el nitrógeno en sulfato amónico, por ataque con sulfúrico concentrado. El sulfato amónico se descompone con una solución concentrada de NaOH en ebullición, recogiendo el amoníaco que destila sobre un volumen en exceso de sulfúrico valorado. El exceso de ácido se valora con sosa.

3.3.4.2.- Determinaciones en el homogenado de cerebro

3.3.4.2.1. Proteínas

Se utiliza el método colorimétrico de LOWRY (1951).

Fundamento:

Mediante el tratamiento de los homogenados con solución alcalina de tartrato de cobre, se forman complejos cúprico-aminoácidos con las proteínas solubles.

La adición del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico), produce una coloración azul intensa, a consecuencia de la reducción del molibdato a óxido de molibdeno, por acción de los complejos cúprico aminoácidos.

La intensidad de coloración producida, es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra.

Técnica:

A 0.1 ml de homogenado diluido al 1/10 (v/v), se añaden 5 ml de reactivo cupro-alcalino (CO_3Na_2 al 2 % en NaOH 0.1 N y SO_4Cu

al 0.5% en tartrato sódico-potásico al 1 %). A los 20 minutos se adicionan 0.5 ml de reactivo fenol. La lectura se lleva a cabo a los 30 minutos a 750 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva de calibración realizada con solución de albúmina purificada a la concentración de 1 mg/ml.

Los datos se expresan en mg de proteína/peso total del órgano.

3.3.4.2.2.- Acido desoxirribonucleico (DNA)

Se utiliza el método de BURTON (1956).

Fundamento:

Al añadir difenilamina al DNA, se origina una coloración como consecuencia de la reacción con la desoxiribosa del ácido nucleico, siendo la absorbancia proporcional a la cantidad de DNA.

Técnica:

Una alícuota de tejido se trata con ácido tricloroacético para precipitar la proteínas. El extracto se mezcla con dos volúmenes del reactivo de difenilamina. Se mantiene a 100°C durante 10 minutos y se mide el color desarrollado a 600 nm.

Los resultados se llevan a una curva patrón constituida con diferentes concentraciones de DNA tipo I.

La cantidad de DNA se expresa en mg por peso total del órgano.

3.3.4.2.3.- Acido ribonucleico (RNA)

El método utilizado es el de DISCHE (1930).

Fundamento:

Se basa en la adición al RNA de orcinol y cloruro férrico, la pentosa ribosa existente en el ácido nucleico da una coloración verde que es proporcional al contenido de RNA de la muestra.

Técnica:

Una alícuota de tejido se trata con ácido tricloroacético. Al extracto se le añade Cl_3Fe al 0.1 % (p/v) en ClH concentrado y el reactivo de orcinol al 10 % en etanol.

Después de llevarlo a 100°C durante 40 minutos, se mide la absorbancia del color desarrollado a 670 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva patrón de RNA.

La cantidad de RNA se expresa en mg por peso total del órgano.

**3.3.4.2.4.- Deoxiribonucleasa ácida
(Deoxiribonucleato-3'Nucleótido Hidrolasa
E.C.3..1.4.6.)**

Se usa el método de Mc DONALD modificado (1955).

Fundamento:

El enzima dexosiribonucleasa ácida es una endonucleasa que actúa sobre todas la uniones de tipo b, es decir, hidroliza las uniones 5' OH de las pentosas y el grupo fosfato de los polinucleótidos.

Su actuación sobre las cadenas de ácido dexosiribonucleico, produce oligonucleótidos cuya extinción puede ser medida espectrofotométricamente a 260 nm y a 25°C . Las lecturas son proporcionales a la cantidad de oligonucleótidos y esta a la actividad enzimática de las muestras ensayadas.

Técnica:

En primer lugar se prepara una solución tampón de acetato sódico de concentración 0.1 M y pH 5. Se obtiene mezclando 70.5 volúmenes de acetato sódico 0.1 M y 29.5 volúmenes de ácido acético 0.1 M. Después se prepara una solución de SO_4Mg de concentración 2 M.

El sustrato de ácido deoxiribonucleico se prepara al 0.5% (p/v). Para ello, se pesan 500 mg de DNA tipo I (sigma) y se mezclan con 10 ml de la solución de acetato sódico 0.1 M a pH 5 y, una vez disuelto, se añade la solución de SO_4Mg 2 M. Se completa con agua destilada hasta 100 ml.

Se continúa con la preparación de una solución de acetato de uranilo al 0.25 % (p/v) en una solución de ácido perclórico 2.5 % (p/p).

La solución stock a pH 7.4 está formada por 0.15 M de ClNa y 0.005 M de CO_3HNa con pH ajustado a 7.4.

También es necesaria una suspensión enzimática de deoxiribonucleasa ácida tipo I (de la casa Sigma) 2.18 UK/ml disuelta en solución salina bicarbonatada. Con ella se establece la curva de calibración en presencia de la solución sustrato de DNA.

La reacción de la solución sustrato de DNA y del homogenado problema se lleva a cabo a 37°C durante 45 minutos.

Al blanco se le trata de igual modo.

Esta reacción se detiene mediante la adición de 0.5 ml de acetato de uranilo al 0.25% y conservación durante 20 minutos a 4°C. Seguidamente, las muestras son centrifugadas a 7000 r.p.m. durante 20 minutos y, tras su decantación, se leen frente al blanco a 260 nm.

Cálculos:

Esta lectura se transfiere a una curva de calibración construida con solución patrón de DNasa ácida.

Tanto las extinciones de la curva de calibración como las problemas, corresponden a la media de dos determinaciones.

Los resultados se obtienen multiplicando por los factores de dilución correspondientes y se expresa por órgano y por mg de proteína.

Una Unidad Kunitz se define como la actividad enzimática que produce un incremento de densidad óptica de 0.001 en las condiciones de ensayo.

3.3.4.2.5.- Ribonucleasa ácida (Ribonucleato piridin-nucleótido-2' transferasa ciclizante
E.C.2.7.7.16)

El método utilizado es el de LAZZARI modificado (1970).

Fundamento:

El enzima ribonucleasa estudiada es una endonucleasa que escinde las uniones en 5' de los pirimidin nucleótidos.

Su actuación sobre las cadenas de ácido ribonucleico, produce oligonucleótidos, cuya extinción puede ser medida espectrofotométricamente a 260 nm.

Las lecturas son proporcionales a la cantidad de oligonucleótidos, y esta a la actividad enzimática de las muestras ensayadas.

Técnica:

Para un volumen de 1 ml se mezclan 0.5 ml de sustrato de RNA al 1% (p/v), en solución tampon de acetato sódico 0.1 M a pH 5 con 0.2 ml de homogenado y se completa el volumen con tampón acetato 0.1 M. La reacción se lleva a cabo a 37°C.

El RNA no digerido se precipita con 1 ml de acetato de uranilo al 0.25 % en perclórico del 2,5%. La mezcla se mantiene dos horas a 0°C y se centrifuga posteriormente durante 20 minutos a 7000 r.p.m.. Todas las

muestras estándares se diluyen 1/10 con solución stock y se determina la absorbancia de los oligoelementos liberados a 260 nm en el espectrofotómetro.

Los resultados se llevan a una curva de calibración construída con soluciones patrón de RNasa ácida que lleva por tubo 0.05-0.005 Kunitz.

La actividad específica del enzima se expresa en Unidades Internacionales en relación al órgano total, y en mUI en relación a los mg de proteína.

3.3.4.2.6.- Fosfatasa ácida (Ortofosfórico monoester fosfohidrolasa E.C.3.1.3.2.)

El método utilizado es el de BESSEY modificado (1946).

Fundamento:

Se basa en utilizar como sustrato el para-nitro-fenilfosfato, que se desdobla mediante la fosfatasa en fosfato y para-nitrofenol, en medio ácido. La intensidad del color amarillo obtenido por la liberación del p-nitrofenol, es proporcional a la concentración de fosfatasa.

Técnica:

Se añade a la muestra problema un volumen de una solución de para-nitrofenil-fosfato $5.5 \mu\text{M}$ en tampón citrato 50 mM a pH 4.8, incubándose a 37°C durante 30 minutos.

La actividad enzimática específica se expresa en microunidades de para-nitrofenol liberado por minuto, después de la adición de NaOH 0.02M.

La absorbancia de este producto se determina a 405 nm.

Los resultados se llevan a una curva de calibración, construída con para-nitrofenol a diferentes concentraciones. La actividad específica del enzima se expresa en micromoles/órgano total y en micromoles /mg de proteína.

3.3.4.2.7.- Fosfatasa alcalina (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa E.C.3.1.3.1.)

El método utilizado es el de BESSEY modificado (1946).

Fundamento:

Se basa en utilizar como sustrato el p-nitrofenil-fosfato. La fosfatasa hidroliza el sustrato en medio alcalino y, al separarse el grupo fosfato, se mide colorimétricamente el p-nitrofenol liberado, cuyo color es proporcional a la actividad de la fosfatasa.

Técnica:

Se añade a la muestra a ensayar un volumen de p-nitrofenilfosfato 5.5 micromolar en tampón glicina 50 mM a pH 10.5. El ensayo se realizó a una temperatura de 37°C.

La actividad enzimática específica se expresa en micromoles de p-nitrofenol liberado por minuto, después de la adición de NaOH 0.02 M.

3.3.4.2.8.- Beta-D- Glucuronidasa (Beta-D-Glucurónido-glucuronohidrolasa E.C.3.2.1.3.1.)

El método utilizado es el reseñado por BERGMAYER modificado (1963).

Fundamento:

El enzima Beta-D-Glucuronidasa actúa sobre el sustrato 4-nitrofenil-beta-D-glucurónido y lo desdobla en ácido glucurónico y p-nitrofenol. Este último es medido colorimétricamente a pH alcalino.

El aumento de p-nitrofenol formado por unidad de tiempo es medida de la actividad de la beta-D-glucuronidasa.

Técnica:

Se trata la muestra con 0.8 ml de acetato buffer 0.2 M a pH 3.8 y con 0.1 ml de ácido 4-nitrofenil- glucopiranosidurónico 0.1 M

disuelto en agua destilada. Se mantiene a 38°C durante 30 minutos.

Se añade entonces 1 ml de NaOH 1 N completando el volumen hasta 5 ml con agua destilada. Se lee la absorbancia a 405 nm.

Los resultados se llevan a una curva de calibración construida con distintas concentraciones de solución enzimática.

Se define la unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 micromol de sustrato por minuto.

La actividad específica del enzima se expresa en unidades en relación a órgano total y mg de proteína.

3.3.4.2.9.- Glutamato-oxalacetato-transaminasa
(L-aspartato: 2-oxo glutarato amino-transferasa
E.C.2.6.1.1.) (GOT)

Se emplea el método de REITMANN y FRANKEL (1957).

Fundamento:

El enzima, al actuar sobre un sustrato formado por L-cetoglutarato y L-aspartato, da lugar, por transaminación, a la formación de glutamato y oxalacetato, el cual, en medio alcalino, forma hidrazonas con la dinitro-fenil-hidrazina.

La absorbancia del color desarrollado es proporcional a la actividad enzimática.

Técnica:

A 1 ml de solución que contiene 0.1 mmol de L-aspartato, 2 μ moles de L-cetoglutarato y 0.1 mmol de tampón fosfato a pH 7.4, se le añade 0.2 ml de la prueba y se incuba a 37°C durante 1 hora.

Se mide la absorbancia que se produce después de añadir 1 μ mol de 2,4-dinitrofenil hidrazina, utilizando una longitud de onda de 546 nm.

Los resultados se llevan a una curva de calibración construída con el sustrato correspondiente.

La actividad específica del enzima se expresa en U.I. por órgano total y por mg de proteína.

3.3.4.2.10.- Glutamato-piruvato-transaminasa (L-alanina: 2-oxo-glutaratoaminotransferasa E.C.2.6.1.2.) (GPT)

Se utiliza el método de REITMANN y FRANKEL (1957).

Fundamento:

El enzima, actuando sobre un sustrato formado por alfa-cetoglutarato y D-L-Alanina da lugar a la formación de glutamato y piruvato por medio de una transaminación.

El piruvato, en medio alcalino, forma hidrazonas con la dinitrofenil-hidrazina siendo el color desarrollado proporcional a la actividad enzimática.

Técnica:

Se añaden 0.2 ml de muestra problema a 1 ml de solución conteniendo 0.2 mmol de D-L-Alanina, 2 μ moles de alfa-cetoglutarato y 0.1 mmol de fosfato a pH 7.4.

Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se mide la absorbancia que se produce después de añadir 1 μ mol de 2,4-dinitrofenilhidrazina y de NaOH 0.4 M.

Los resultados se llevan a una curva de calibración construida con el sustrato correspondiente.

La actividad específica del enzima se expresa en U.I. en relación a órgano total ó en U.I. por mg de proteína.

3.3.4.3.- Determinaciones en plasma

3.3.4.3.1.- Urea

Se usa el método del desdoblamiento con ureasa, que constituye la reacción de Berthelot (FAWCETT y SCOTT, 1960).

Fundamento:

La ureasa actúa sobre la urea formándose carbonato de amonio. Los iones de amonio reaccionan con fenol e hipoclorito, formando un complejo coloreado.

Técnica:

0.01 ml de plasma tratados con 0.05 ml de solución tampón ureasa (tampón fosfato 50 mmol/L y ureasa ≥ 0.2 U/ml) se incuban en baño a 37°C.

Se añaden entonces 2.5 de solución fenol (fenol 0.106 mol/l y nitroprusiato sódico 0.17 mmol/l) y 2.5 ml de solución de hipoclorito sódico (11 mM y NaOH 0.125 N) introduciéndose inmediatamente en baño a 37°C durante 15 minutos.

Se miden entonces las extinciones de las pruebas y los estándares en fotocolorímetro a 546 nm.

Los resultados se llevan a una curva patrón de urea y se expresan en mg/100 ml.

El cálculo del nitrógeno ureico se realiza según la fórmula:

$$C = 14 \text{ Ext (prueba) / Ext (estandar)}$$

Teniendo en cuenta los factores de dilución se expresan en mg/100 ml de plasma.

3.3.4.3.2.- Colesterol

El método utilizado es el de ROSCHLAU y col. (1975) (TRINDER, 1969b).

Fundamento:

El colesterol liberado de sus ésteres por la enzima colesterolesterasa es oxidado liberando agua oxigenada la cual reacciona con la 4-aminofenazona en presencia de fenol, dando lugar a la aparición de color (p-benzoquinona-monoimino-fenazona).

Técnica:

0.01 ml de plasma son tratados con 4 ml de reactivo colesterol, constituido por la mezcla de tres soluciones que contienen fenol y metanol en tampón fosfato pH 7.7; 4-aminofenazona, metanol e hidroxipoli-etoxi-dodecano en tampón fosfato y la tercera, una mezcla de las tres enzimas que catalizan las reacciones anteriormente citadas.

Se incuba a 28°C durante 1 hora y se realiza la lectura en espectrofotómetro a 500 nm.

Los resultados se llevan a una curva patrón realizada con distintas concentraciones de colesterol.

La concentración plasmática de colesterol se expresa en mg/100 ml.

3.3.4.3.3.- Glucosa

Se emplea el método de TRINDER (1969a).

Fundamento:

La oxidación de la glucosa en presencia de O₂ y H₂O, mediante la enzima glucosa oxidasa origina agua oxigenada que al reaccionar con 4-aminofenazona y fenol origina un compuesto coloreado.

Técnica:

0.02 ml de plasma se tratan con 2 ml de solución reactiva, cuya composición es:

Tampón trifosfato	180.00 mmol/l
Fenol	11.00 mmol/l
3-4-Diclorofenol	2.10 mmol/l
Eter poliglicólico de alcohol graso	0.24 %
4-aminofenazona	0.80 mmol/l
Peroxidasa	0.90 U/ml
Glucosa oxidasa	15.00 U/ml

Después de incubar en baño a 25°C durante 30 minutos se realiza la lectura a 510 nm entre 30-90 minutos.

Los resultados se llevan a una curva patrón realizada con una solución estándar de glucosa tomando como blanco la solución reactiva. Los resultados se expresan en mmol/l.

3.3.4.3.4.- Insulina

Se utiliza el método radioinmunológico descrito por YALOW y BERGSON (1956, 1959, 1960). Marcaje según HUNTER y GREENWOOD (1962).

Fundamento:

Se basa en la reacción de competición entre la insulina de la muestra problema (insulina fría) y una cantidad constante de insulina marcada con ^{125}I para combinarse con un anticuerpo específico para ellas.

La combinación de la insulina marcada con el anticuerpo se cuantificó midiendo la radiactividad en la fracción de insulina libre, no combinada con el anticuerpo. Este parámetro es influido por la concentración de insulina fría.

Cálculos:

La fórmula de aplicación, desarrollada y descrita en el método adquiere de modo simplificado la expresión:

$$C^*/I^* = C/I = B/F$$

Siendo C^* , la concentración de la hormona marcada ligada al anticuerpo; I^* , la concentración de la hormona marcada libre; C , la concentración de la hormona no marcada ligada al anticuerpo; I , la concentración de la hormona no marcada libre.

Los cocientes B/F (entre la hormona ligada y libre) para la hormona marcada y para la hormona no marcada han de ser siempre iguales. Además, el cociente C^*/I^* disminuye al aumentar la concentración de insulina fría (I_0) porque disminuye C^* y aumenta I^* ya que: $C^* + I^* = I_0^* = \text{cte}$ donde I_0^* es la concentración total de insulina ^{125}I , que es una constante de radioinmuno ensayo.

Se utiliza la relación existente entre la radioactividad (CPM) en la fracción de hormona libre (I^*) o combinada al anticuerpo (C^*) y la cantidad total de insulina fría para calcular la concentración de ésta última en las muestras.

Se realiza una curva estándar con diluciones conocidas de insulina de rata (Novo Research Institute) que se harán reaccionar con el anticuerpo en presencia de una cantidad constante de insulina marcada.

Con esta curva se calcula la relación entre la insulina marcada ligada al anticuerpo C^* y la insulina fría total de las muestras I_0 .

3.3.4.3.5.- Proteínas totales

Se utiliza el método Biuret (WELCHSELBANM, 1946).

Fundamento:

En solución alcalina, las proteínas forman un complejo coloreado con los iones de cobre procediéndose a su valoración.

Técnica:

A 25 μ l de plasma se les añade 1.25 ml de reactivo de Biuret incubándose a 37°C durante 30 minutos.

Se mide la extinción en un espectrofotómetro a 550 nm y se obtiene la concentración de proteínas problema al ser comparada con la concentración y extinción del estandar.

El resultado se expresa en g/100.

3.3.4.3.6.- Fracciones proteicas

Se usa el método de electroforesis de zona (TISELIUS y FLODIN, 1953).

Fundamento:

Se basa en disponer una mezcla proteica en el extremo de un soporte adecuado, aplicando una diferencia de potencial produciéndose así una migración de los constituyentes con una velocidad propia de cada uno de ellos, posibilitando su separación y medida.

Técnica:

Se utilizan tiras de acetato de celulosa que se sumergen en tampón veronal sódico 0.04 M a pH 9.

Las muestras se depositan en la superficie de la tira, en el polo negativo (cátodo) y se somete a la muestra a una diferencia de potencial de 200 voltios durante 30 minutos.

Seguidamente se tiñen con negro amido 10B (0.5 g disueltos en 45 ml de metanol + 45 ml de agua + 10 ml de ácido acético) y se decoloran después con una mezcla de metanol, ácido acético y agua destilada en proporción 47.5 : 47.5 : 5 (V:V).

El transparentador se compone de metanol, ciclohexanona y ácido acético en proporción de 87 : 3 : 10 (V:V), respectivamente.

La determinación cuantitativa de las fracciones se realiza con un densitómetro. Las densidades ópticas determinan la curva de electroforesis de las proteínas. El área de cada pico es proporcional a la concentración de la fracción proteica considerada.

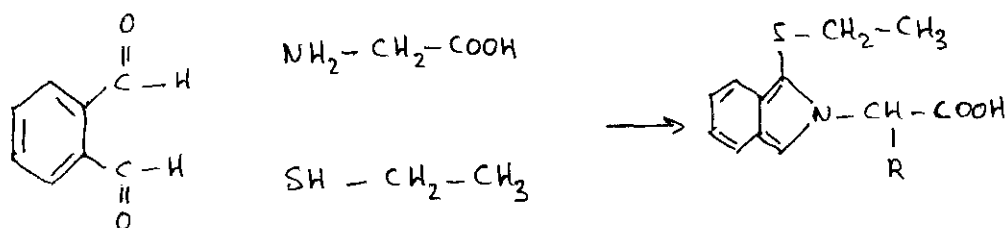
Los resultados se expresan en g/100 ml de plasma.

3.3.4.3.7.- Aminoácidos libres

Se determinan por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (H.P.L.C.) (JONES y col., 1981).

Fundamento:

Los aminoácidos reaccionan con orto-ftalaldehído en presencia de 2-mercapto-etanol, dan lugar a un compuesto que es un isoindol-tiosustituido, el cual es altamente fluorescente y detectable por las técnicas analíticas usuales.



O-FTALALDEHIDO + AMINOACIDO + TIOL = ISOINDOL-TIOSUSTITUIDO

Técnica:

Sangre arterial recogida en tubos de vidrio heparinizados, se centrifuga a 700 G durante 10 minutos. Se separa así el plasma de los glóbulos rojos, conservándose ambos en el congelador a -20°C para su posterior análisis.

Las proteínas se separan del plasma con metanol absoluto, en la proporción de 100 μl de plasma y 2 ml de metanol. Esta mezcla se centrifuga a 700 g/10 minutos y en el sobrenadante se determina los aminoácidos libres.

En el caso de los glóbulos rojos, se mezclan en las mismas proporciones que el plasma con metanol y se someten a sonicación para romper las membranas de los mismos.

Cuando se trata de tejidos, una muestra de 1g se trata con 50 ml de tricloroacético al 10% (P/V). Se homogenizan en un potter con pistón de teflón, con el fin de extraer los aminoácidos libres. Se centrifuga a 3000 r.p.m./15 minutos y el sobrenadante se evapora a sequedad al vacío a 40°C , el extracto se conserva en congelación a -20°C para analizar los aminoácidos libres disolviéndolo en una solución de borato buffer 0.4 M pH = 9.5. Una alícuota se procesa con la solución derivatizante para ser analizada en el cromatógrafo líquido (H.P.L.C.).

Reactivo y estándar de aminoácidos

*Eluyentes

Se emplean las soluciones A y B, utilizadas para formar gradiente.

-Solución A: Formada por una mezcla de acetato sódico 0.05 M (pH=5.9), metanol (H.P.L.C.) y tetrahidrofurano (A.R.) en las proporciones 800:10:10 (V:V:V) respectivamente.

-Solución B: Formada por una mezcla de acetato sódico 0.05 M (pH=5.9) y metanol (H.P.L.C.) en la proporción de 200:800 (V:V) respectivamente.

Ambas soluciones se filtran a vacío a través de filtros

millipore de celulosa, tipo HULP, con poro de 0.45 μm . Una vez filtradas se sonicar durante 10-15 minutos para eliminar burbujas de aire, indeseables en cromatografía.

*Solución derivatizante

Se disuelven 25 mg de ortoftalaldehído (O.P.A.) en 0.63 ml de metanol absoluto (H.P.L.C.). Se añaden 25 μl de 2-mercapto-etanol y 5.6 ml de borato sódico 0.4 M (pH=9.5).

A la mezcla así formada se le hace fluir nitrógeno gaseoso, mediante una pipeta Pasteur, durante 10 minutos, para desalojar el oxígeno y conservarla en atmósfera inerte. Se deja reposar 24 horas antes de usarla. Cada semana se añaden 25 μl de 2-mercapto-etanol para matener el reactivo en su forma reducida.

Para evitar contaminaciones y oxidaciones se prepara de nuevo cada siete días.

* Solución estándar de aminoácidos y estándar interno

La solución estándar se prepara con 19 aminoácidos a una concentración de 5 pmol/ μl cada uno de ellos. Se disuelven en metanol:agua (V:V). Algunos aminoácidos como la tirosina se disuelven muy mal, siendo necesario disolverla previamente por sonicación.

El estándar interno elegido es el ácido alfa-aminobutírico (α -ABA). Se prepara la solución a una concentración de 160 pmol/20 μl .

Estas dos soluciones se conservan a -20°C .

*Proceso de derivatización

En primer lugar, se prepara una solución de dodecil sulfato sódico (S.D.S.) al 2% en borato sódico 0.4 M (pH=9.5) y otra de Brij-35 al 2%, también en borato sódico 0.4 M (pH=9.5).

El proceso de derivatización se desarrolla del modo siguiente: A 5 μ l de solución estándar de aminoácidos, que contiene 5 pmol/ μ l, se le añaden 2.5 μ l de S.D.S. al 2% en borato sódico 0.4 M (pH=9.5), 2.5 μ l de Brij-35 al 2% en borato sódico 0.4 M (pH=9.5) y 5 μ l de solución derivatizante.

Se agita la mezcla durante 1 minuto y se agrega 5 μ l de fosfato potásico 0.1 M (pH=4). Se toman 20 μ l de la mezcla y se inyectan en el cromatógrafo que corresponde a 25 pmol de cada aminoácido.

Antes de la cuantificación de las muestras se realiza una curva de calibración con concentraciones del estándar comprendidas entre 25-500 pmol en 20 μ l, observándose que para todos los aminoácidos, los valores más favorables son los comprendidos entre 100 y 150 pmol, con un error de evaluación mínimo.

* Cálculos

Se realiza el cálculo de los factores de respuesta (FR) de cada uno de los aminoácidos del estándar mediante la fórmula:

$$FR = \frac{128 \text{ pmol}}{\text{Area del pico en el estándar}}$$

Para conocer la concentración de un aminoácido problema se aplica la fórmula:

$$\text{Concentración (pmol)} = \frac{FR \text{ del AA estándar} * \text{Area del AA problema}}{FR \text{ del } \alpha\text{-ABA estándar} * \text{Area del } \alpha\text{-ABA problema}}$$

Los resultados se expresan en μ mol/l de plasma o glóbulos rojos, y si se trata de órganos en μ mol/g de tejido, mediante la multiplicación por los factores apropiados.

3.3.4.4.- Determinaciones en orina

3.3.4.4.1.- Urea

Se utiliza el método del desdoblamiento con ureasa que constituye la reacción de Berthelot (FAWCETT y SCOTT, 1960).

Fundamento:

La ureasa actúa sobre la urea formándose carbonato de amonio. Los iones de amonio reaccionan con fenol e hipoclorito, formando un complejo coloreado.

Técnica:

0.1 mL de la dilución de orina se llevan a 5 ml con agua destilada.

Se toman 0.2 ml y se procede de modo semejante al plasma.

Los resultados se expresan en mg/día.

3.3.4.4.2.- Creatinina

Utilizamos el método de Jaffé con desproteinización modificado según POPPER (1937) y SEELIG y WUEST (1969).

Fundamento:

La creatinina forma con picrato, en solución alcalina, un complejo coloreado que es el que se valora.

Técnica:

0.5 ml de la solución de orina se tratan con 0.5 ml de ácido tricloro acético 1.2 M y 1 ml de una solución formada por ácido pícrico (35 mmol/l) y NaOH (0.32 mol/l).

Después de incubar a 25°C durante 20 minutos se lee en espectrofotómetro a 520 nm.

Los resultados se llevan a una curva patrón realizada con creatinina, expresándose en mg/día.

3.3.4.5.- Tratamiento estadístico

El estudio estadístico de los datos se llevó a cabo, en primer lugar, analizando la distribución de las distintas variables en la muestra.

Se observó así que, a pesar del reducido tamaño de los grupos de análisis, cada una de las variables en el conjunto de la muestra seguía una distribución próxima a lo normal, por lo que optamos por la realización de pruebas paramétricas, asumiendo la normalidad en los grupos.

En el tratamiento estadístico de las observaciones se ha realizado un análisis de la varianza (JOHNSON y BHATTACHARYYA, 1987) en cada uno de los tratamientos. Las comparaciones entre pares de grupos se ha efectuado mediante el test de DUNCAHN'S.

El nivel mínimo de significación se ha establecido en el 5%.

La codificación de los datos se ha realizado en un ordenador IBM 370, y el cálculo estadístico con ayuda de los programas de la serie SAS, versión S.18 (SAS INSTITUTE NORTH CAROLINA, 1988).

4.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este experimento se encuentran ordenados en tablas y representados en gráficas con la siguiente distribución:

- TABLA 1: INGESTA Y PESO CORPORAL
- TABLA 2: BALANCE DE NITROGENO, UREA Y NITROGENO UREICO EN PLASMA
- TABLA 3: UREA Y CREATININA EN ORINA
- TABLA 4: COLESTEROL, GLUCOSA E INSULINA EN PLASMA
- TABLA 5: PROTEINAS TOTALES Y FRACCIONES PROTEICAS PLASMATICAS
- TABLA 6: PARAMETROS PONDERALES Y PROTEINAS SOLUBLES EN CEREBRO
- TABLA 7: DNA, NUMERO DE NUCLEOS, PROTEINAS/DNA Y TAMAÑO CELULAR EN CEREBRO
- TABLA 8: ACTIVIDAD DNAsa ACIDA EN CEREBRO
- TABLA 9: RNA, RNA/DNA Y RNA/PROTEINA EN CEREBRO
- TABLA 10: ACTIVIDAD RNAsa ACIDA EN CEREBRO
- TABLA 11: ACTIVIDADES DE LAS FOSFATASAS ACIDA Y ALCALINA EN CEREBRO
- TABLA 12: ACTIVIDAD DE BETA-GLUCURONIDASA EN CEREBRO
- TABLA 13: ACTIVIDAD DE GPT Y GOT EN CEREBRO
- TABLA 14: AMINOACIDOS RAMIFICADOS LIBRES EN PLASMA
- TABLA 15: AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES EN PLASMA
- TABLA 16: AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES EN PLASMA

- TABLA 17: AAA, AAN, AAR/AAA EN PLASMA
- TABLA 18: AMINOACIDOS BASICOS LIBRES EN PLASMA
- TABLA 19: AMINOACIDOS AZUFRADOS LIBRES EN PLASMA
- TABLA 20: AAE, AANE, AAE/AANE, AAT EN PLASMA
- TABLAS 21, 22, 23 Y 24: RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES EN PLASMA
- TABLA 25: AMINOACIDOS RAMIFICADOS LIBRES EN GLOBULOS ROJOS
- TABLA 26: AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES EN GLOBULOS ROJOS
- TABLA 27: AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES EN GLOBULOS ROJOS
- TABLA 28: AAA, AAN, AAR/AAA EN GLOBULOS ROJOS
- TABLA 29: AMINOACIDOS BASICOS LIBRES EN GLOBULOS ROJOS
- TABLA 30: AAE, AANE, AAE/AANE, AAT EN GLOBULOS ROJOS
- TABLAS 31, 32, 33 Y 34: RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES EN GLOBULOS ROJOS
- TABLA 35: AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES EN CEREBRO
- TABLA 36: AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES EN CEREBRO
- TABLA 37: AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES EN CEREBRO
- TABLA 38: AAA, AAN, AAR/AAA EN CEREBRO
- TABLA 39: AMINOACIDOS BASICOS Y AZUFRADOS LIBRES EN CEREBRO
- TABLA 40: AAE, AANE, AAE/AANE, AAT EN CEREBRO
- TABLA 41 Y 42: RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES EN CEREBRO
- *GRAFICA I: INGESTA Y PESO CORPORAL
- *GRAFICA II: BALANCE DE NITROGENO Y UREA EN ORINA
- *GRAFICA III: NIVEL PLASMATICO DE GLUCOSA, INSULINA Y COLESTEROL
- *GRAFICA IV: PESO Y PROTEINAS SOLUBLES EN CEREBRO
- *GRAFICA V: NIVEL DE DNA Y ACTIVIDAD DNAsa EN CEREBRO
- *GRAFICA VI: NUMERO DE NUCLEOS Y TAMAÑO CELULAR EN CEREBRO
- *GRAFICA VII: NIVEL DE RNA Y ACTIVIDAD RNAsa EN CEREBRO
- *GRAFICA VIII: NIVEL DE NUCLEOTIDO POR CELULA (RNA/DNA) Y CAPACIDAD DE SINTESIS PROTEICA (RNA/PROTEINA) EN CEREBRO

*GRAFICA IX: ACTIVIDAD HIDROLASICA EN CEREBRO: FOSFATASAS ACIDA Y ALCALINA

*GRAFICA X: ACTIVIDAD TRANSAMINASICA EN CEREBRO: GPT Y GOT

*GRAFICA XI: AAR EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XII: CONCENTRACION DE ACIDO ASPARTICO LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XIII: CONCENTRACION DE ASPARRAGINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XIV: CONCENTRACION DE ACIDO GLUTAMICO LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XV: CONCENTRACION DE GLUTAMINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XVI: CONCENTRACION DE SERINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XVII: CONCENTRACION DE GLICINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XVIII: CONCENTRACION DE TREONINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XIX: CONCENTRACION DE ALANINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XX: AAA EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XXI: AAN EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XXII: CONCENTRACION DE ARGININA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XXIII: AAE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XXIV: AANE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XXV: AAT EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

*GRAFICA XXVI: AAE/AANE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

TABLA 1

INGESTA (g/día) Y PESO CORPORAL (g)

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
INGESTA			
CONTROL	13.25 ± 0.56 ^{a,1}	13.87 ± 0.53 ^{a,1}	14.35 ± 0.71 ^{a,1}
LOTE II	6.58 ± 0.33 ^{b,2}	7.99 ± 0.52 ^{b,1,2}	9.02 ± 0.60 ^{b,1}
LOTE III	3.44 ± 0.24 ^{c,1}	3.90 ± 0.02 ^{c,1}	---
PESO CORPORAL			
CONTROL	109.60 ± 4.70 ^{a,1}	125.40 ± 3.07 ^{a,1}	146.82 ± 5.55 ^{a,2}
LOTE II	90.70 ± 2.25 ^{b,1}	79.25 ± 5.89 ^{b,1,2}	68.85 ± 3.31 ^{b,2}
LOTE III	77.60 ± 4.56 ^{b,1}	74.53 ± 2.09 ^{b,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

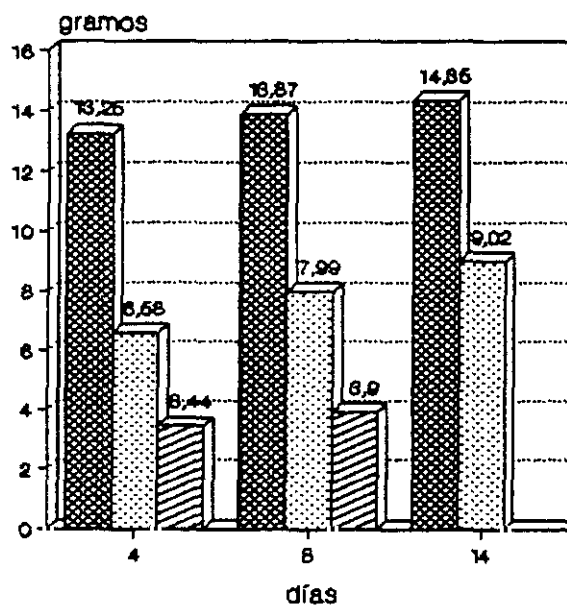
Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

GRAFICA 1.- INGESTA Y PESO CORPORAL

INGESTA



PESO CORPORAL

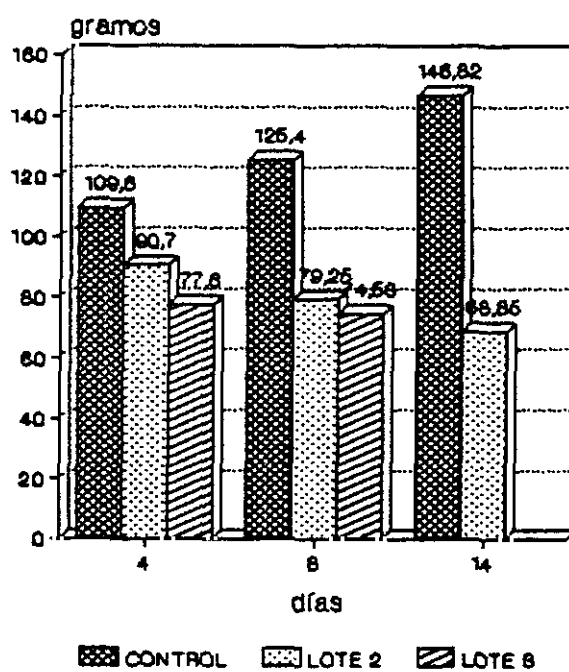


TABLA 2

BALANCE DE NITROGENO (mg/día), UREA (mg/100 ml) Y

NITROGENO UREICO (mg/100 ml) EN PLASMA

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
BALANCE DE NITROGENO			
CONTROL	145.00 ± 10.83 ^{a,1}	167.40 ± 9.12 ^{a,1}	152.78 ± 8.94 ^{a,1}
LOTE II	44.57 ± 5.82 ^{b,1}	46.92 ± 15.83 ^{b,1}	77.68 ± 15.45 ^{b,1}
LOTE III	46.24 ± 4.26 ^{b,1}	-2.60 ± 2.70 ^{c,2}	---
UREA			
CONTROL	15.46 ± 1.00 ^{a,1}	16.21 ± 1.46 ^{a,1,2}	20.32 ± 1.10 ^{a,2}
LOTE II	36.38 ± 3.30 ^{b,1,2}	40.86 ± 1.03 ^{b,1}	29.72 ± 0.80 ^{b,2}
LOTE III	32.40 ± 5.43 ^{b,1}	67.99 ± 9.50 ^{c,2}	---
NITROGENO UREICO			
CONTROL	7.21 ± 0.47 ^{a,1}	7.56 ± 0.68 ^{a,1,2}	9.55 ± 0.48 ^{a,2}
LOTE II	17.35 ± 1.25 ^{b,1}	19.06 ± 0.48 ^{b,1}	13.86 ± 0.37 ^{b,2}
LOTE III	17.62 ± 1.76 ^{b,1}	31.73 ± 4.44 ^{c,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 3

UREA (mg/día) Y CREATININA (mg/día) EN ORINA

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
UREA			
CONTROL	39.80 ± 6.84 ^{a,1}	71.86 ± 11.04 ^{a,1,2}	80.06 ± 9.53 ^{a,2}
LOTE II	76.18 ± 10.88 ^{a,b,1}	266.72 ± 55.03 ^{b,2}	135.14 ± 13.06 ^{b,1}
LOTE III	127.50 ± 30.19 ^{b,1}	273.49 ± 76.09 ^{b,1}	---
CREATININA			
CONTROL	0.69 ± 0.11 ^{a,1}	2.13 ± 0.12 ^{a,2}	1.48 ± 0.14 ^{a,3}
LOTE II	0.66 ± 0.11 ^{a,1}	1.47 ± 0.23 ^{a,2}	0.85 ± 0.07 ^{b,1,2}
LOTE III	0.76 ± 0.13 ^{a,1}	1.30 ± 0.43 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

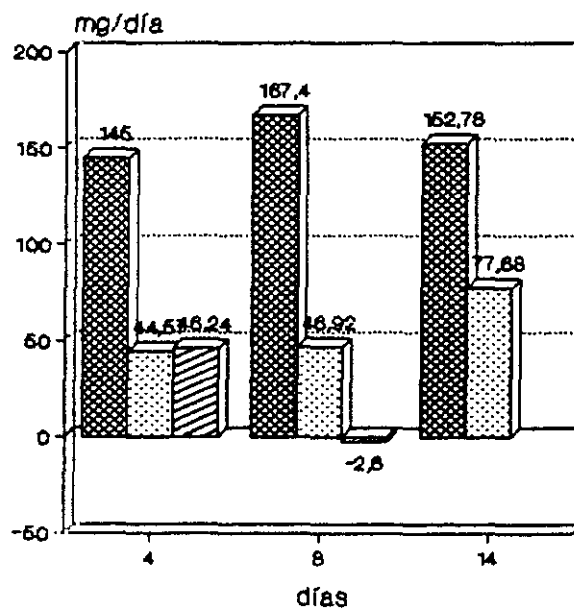
Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

GRAFICA 11.- BALANCE DE NITROGENO Y UREA EN ORINA

BALANCE DE NITROGENO



UREA EN ORINA

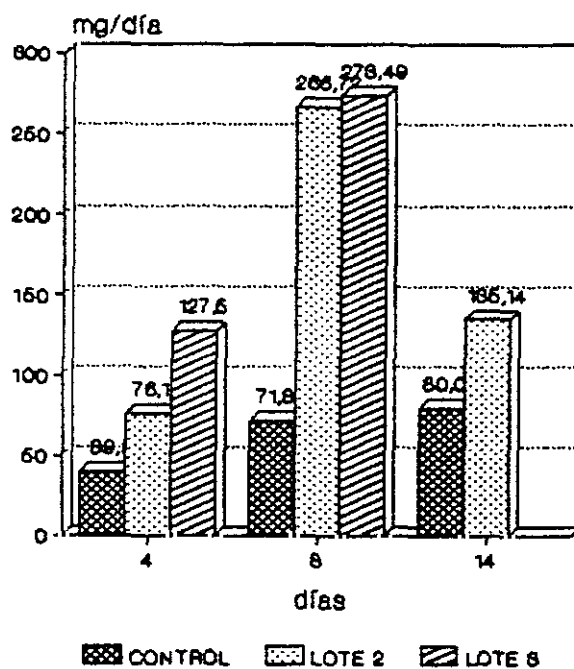


TABLA 4**COLESTEROL (mg/100 ml), GLUCOSA (mmol/l) E INSULINA (μUI/ml)****EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
COLESTEROL			
CONTROL	73.12 ± 1.46 ^{a,1,2}	81.90 ± 6.54 ^{a,1}	62.89 ± 3.19 ^{a,2}
LOTE 11	40.95 ± 2.76 ^{b,1}	61.42 ± 3.27 ^{b,2}	43.87 ± 5.27 ^{b,1}
LOTE 111	59.96 ± 4.33 ^{c,1}	40.95 ± 5.47 ^{c,2}	---
GLUCOSA			
CONTROL	8.70 ± 0.48 ^{a,1}	8.34 ± 1.67 ^{a,1}	7.98 ± 1.88 ^{a,1}
LOTE 11	9.05 ± 0.08 ^{a,1}	6.20 ± 0.66 ^{a,1}	8.09 ± 2.92 ^{a,1}
LOTE 111	8.86 ± 0.17 ^{a,1}	5.54 ± 1.02 ^{a,2}	---
INSULINA			
CONTROL	83.39 ± 14.50 ^{a,1}	103.19 ± 21.60 ^{a,1}	201.58 ± 19.63 ^{a,1}
LOTE 11	84.79 ± 10.19 ^{a,1}	37.20 ± 2.39 ^{b,2}	91.19 ± 1.20 ^{b,1}
LOTE 111	55.35 ± 18.19 ^{a,1}	18.39 ± 1.04 ^{c,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

GRAFICA 111.- NIVEL PLASMATICO DE GLUCOSA, INSULINA Y COLESTEROL

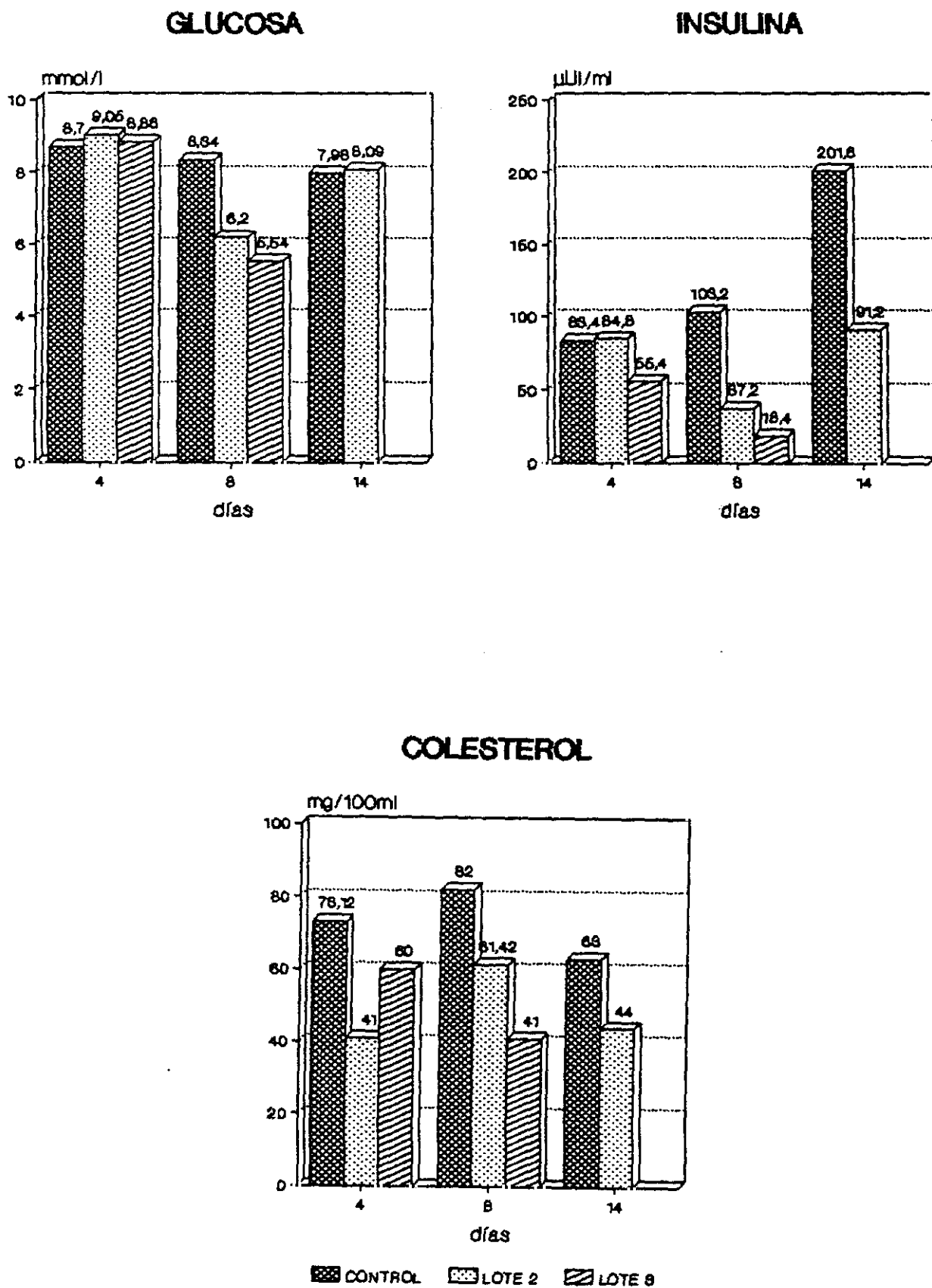


TABLA 5**PROTEINAS TOTALES Y FRACCIONES PROTEICAS PLASMATICAS (g/100 ml)**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
PROTEINAS TOTALES			
CONTROL	5.50 ± 0.15 ^{a,1}	6.10 ± 0.09 ^{a,1}	5.85 ± 0.28 ^{a,1}
LOTE 11	4.91 ± 0.11 ^{a,1}	4.86 ± 0.13 ^{b,1}	3.86 ± 0.10 ^{b,2}
LOTE 111	5.48 ± 0.33 ^{a,1}	4.63 ± 0.33 ^{b,1}	---
ALBUMINA			
CONTROL	2.96 ± 0.20 ^{a,1}	3.38 ± 0.18 ^{a,1}	3.37 ± 1.95 ^{a,1}
LOTE 11	2.58 ± 1.49 ^{a,1}	2.66 ± 0.21 ^{a,1}	2.37 ± 0.15 ^{b,1}
LOTE 111	3.10 ± 0.23 ^{a,1}	2.75 ± 1.59 ^{a,1}	---
ALFA-GLOBULINAS			
CONTROL	0.48 ± 0.01 ^{a,1}	0.58 ± 0.09 ^{a,1}	0.55 ± 0.32 ^{a,1}
LOTE 11	0.50 ± 0.04 ^{a,1}	0.42 ± 0.24 ^{a,1}	0.40 ± 0.23 ^{a,1}
LOTE 111	0.57 ± 0.05 ^{a,1}	0.32 ± 0.18 ^{a,2}	---
BETA-GLOBULINAS			
CONTROL	1.54 ± 0.05 ^{a,1}	1.52 ± 0.09 ^{a,1}	1.52 ± 0.09 ^{a,1}
LOTE 11	1.22 ± 0.09 ^{a,b,1}	1.02 ± 0.09 ^{a,b,1,2}	1.34 ± 0.10 ^{a,2}
LOTE 111	1.06 ± 0.05 ^{b,1}	0.90 ± 0.07 ^{b,1}	---
GAMMA-GLOBULINAS			
CONTROL	0.52 ± 0.06 ^{a,1}	0.53 ± 0.05 ^{a,1}	0.62 ± 0.05 ^{a,1}
LOTE 11	0.61 ± 0.11 ^{a,1}	0.77 ± 0.10 ^{a,1}	0.49 ± 0.06 ^{a,1}
LOTE 111	0.77 ± 0.05 ^{a,1}	0.67 ± 0.08 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 6**PARAMETROS PONDERALES Y PROTEINAS SOLUBLES EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
PESO CEREBRO (g)			
CONTROL	1.04 ± 0.09 ^{a,1}	1.20 ± 0.06 ^{a,1}	1.16 ± 0.08 ^{a,1}
LOTE II	1.15 ± 0.05 ^{a,1}	1.12 ± 0.06 ^{a,1}	0.78 ± 0.07 ^{b,2}
LOTE III	1.00 ± 0.05 ^{a,1}	1.10 ± 0.04 ^{a,1}	---
INDICE CEREBROSOMATICO (1)			
CONTROL	0.010±10*10 ^{-4a,1}	0.010± 1*10 ^{-4a,1}	0.008± 4*10 ^{-4a,1}
LOTE II	0.013±10*10 ^{-4b,1}	0.014± 4*10 ^{-4b,1}	0.012±10*10 ^{-4a,1}
LOTE III	0.013±10*10 ^{-4b,1}	0.015±10*10 ^{-4b,1}	---
PROTEINAS SOLUBLES (mg/cerebro)			
CONTROL	17.76 ± 1.60 ^{a,b,1}	19.91 ± 0.92 ^{a,b,1}	19.62 ± 1.53 ^{a,1}
LOTE II	22.78 ± 2.51 ^{a,1}	23.23 ± 1.18 ^{a,1}	11.41 ± 1.75 ^{b,2}
LOTE III	13.84 ± 0.75 ^{b,1}	16.94 ± 1.10 ^{b,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) Peso cerebro/peso corporal

GRAFICA 1V.- PESO Y PROTEINAS SOLUBLES EN CEREBRO

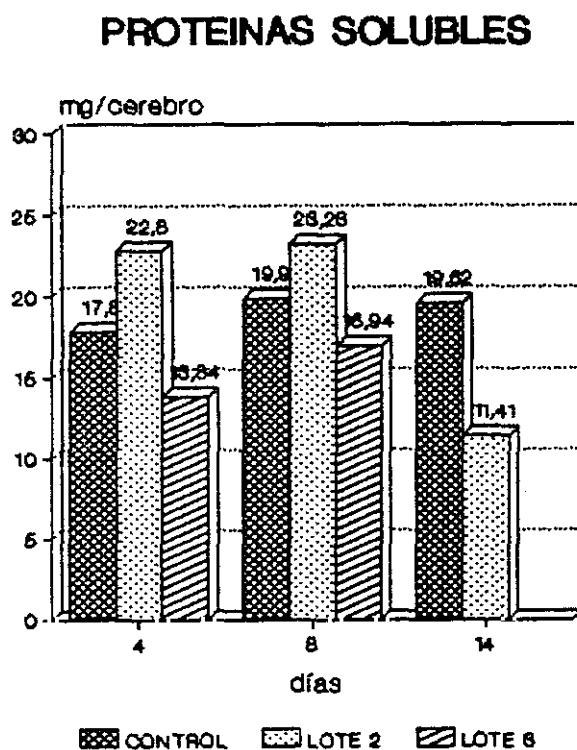
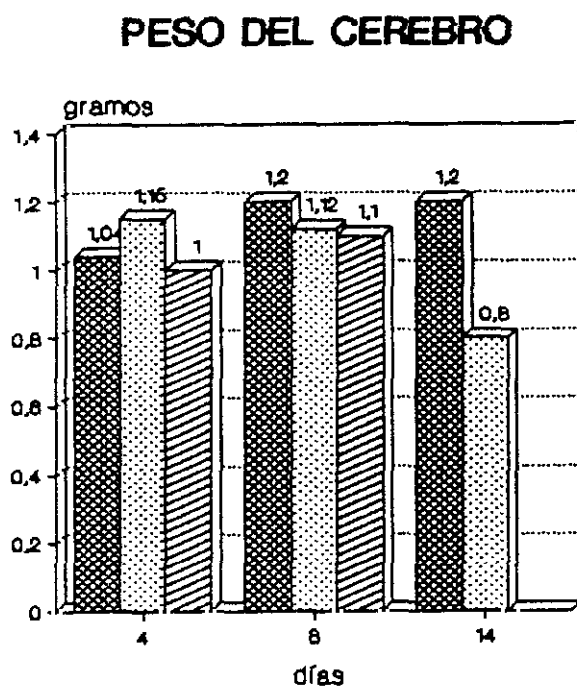


TABLA 7**DNA, NUMERO DE NUCLEOS, PROTEINA/DNA Y TAMAÑO CELULAR EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
DNA (mg/cerebro)			
CONTROL	1.15 ± 0.32 ^{a,1}	1.63 ± 0.41 ^{a,1}	2.16 ± 0.28 ^{a,1}
LOTE 11	2.20 ± 0.18 ^{b,1}	1.11 ± 0.30 ^{a,2}	1.06 ± 0.09 ^{b,2}
LOTE 111	2.24 ± 0.12 ^{b,1}	2.40 ± 0.38 ^{a,1}	---
NUMERO DE NUCLEOS (1) (millones)			
CONTROL	185.08 ± 52.26 ^{a,1}	262.90 ± 65.57 ^{a,1}	347.58 ± 44.71 ^{a,1}
LOTE 11	355.24 ± 29.51 ^{b,1}	179.03 ± 48.80 ^{a,2}	171.37 ± 15.08 ^{b,2}
LOTE 111	361.69 ± 19.00 ^{b,1}	388.00 ± 60.90 ^{a,1}	---
PROTEINA/DNA			
CONTROL	23.58 ± 7.55 ^{a,1}	9.08 ± 0.38 ^{a,1}	9.57 ± 1.23 ^{a,1}
LOTE 11	10.40 ± 0.96 ^{a,b,1}	16.14 ± 1.34 ^{b,2}	10.81 ± 1.35 ^{a,1}
LOTE 111	6.22 ± 0.40 ^{b,1}	7.92 ± 1.53 ^{a,1}	---
TAMAÑO CELULAR (2) (ng)			
CONTROL	8.39 ± 2.58 ^{a,1}	3.38 ± 0.08 ^{a,1}	3.52 ± 0.40 ^{a,1}
LOTE 11	3.30 ± 0.24 ^{a,1}	4.70 ± 0.27 ^{a,2}	4.65 ± 0.37 ^{a,2}
LOTE 111	2.78 ± 0.11 ^{a,1}	3.20 ± 0.62 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) (DNA*1000)/6.2

(2) (Peso cerebro/Nº nucleos) * 1000

TABLA 8**ACTIVIDAD DNASA ACIDA (U.I.) EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
DNASA/CEREBRO			
CONTROL	18.07 ± 0.00 ^{a,1}	24.44 ± 0.44 ^{a,1,2}	34.82 ± 3.60 ^{a,2}
LOTE II	19.33 ± 0.74 ^{a,1}	20.68 ± 0.83 ^{b,1}	10.14 ± 1.21 ^{b,1}
LOTE III	6.43 ± 0.35 ^{b,1}	7.83 ± 0.32 ^{c,2}	---
DNASA/mg PROTEINA			
CONTROL	1.02 ± 0.00 ^{a,1}	1.23 ± 0.04 ^{a,1}	1.77 ± 0.08 ^{a,2}
LOTE II	0.89 ± 0.09 ^{a,1}	1.09 ± 0.12 ^{a,1}	0.98 ± 0.19 ^{b,1}
LOTE III	0.47 ± 0.02 ^{b,1}	0.47 ± 0.04 ^{b,1}	---
DNASA/DNA			
CONTROL	8.86 ± 0.00 ^{a,1}	36.78 ± 21.94 ^{a,1}	17.25 ± 2.83 ^{a,1}
LOTE II	8.98 ± 0.67 ^{a,1}	72.58 ± 50.70 ^{a,1}	9.80 ± 1.44 ^{a,1}
LOTE III	2.90 ± 0.22 ^{b,1}	3.70 ± 0.76 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

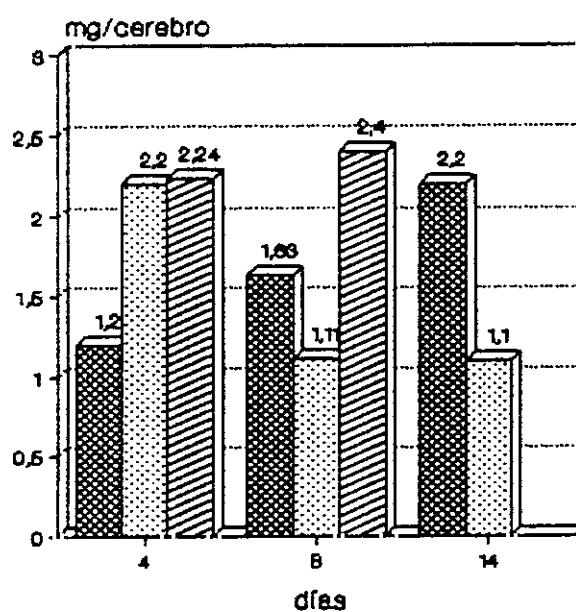
Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) entre días.

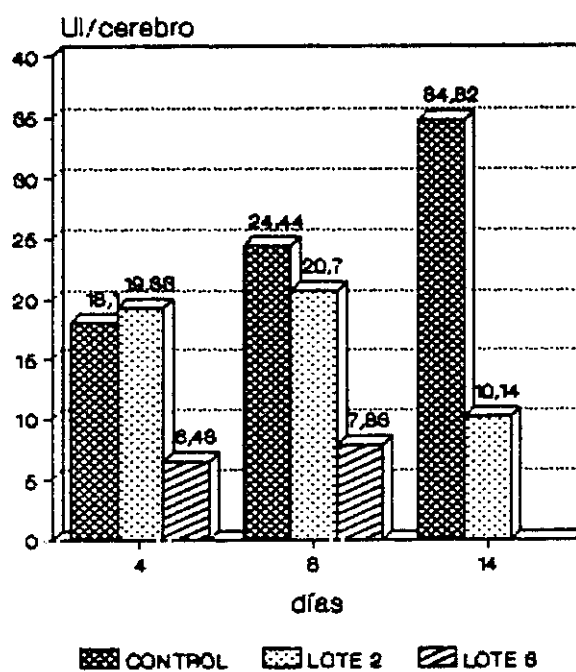
--- Efecto letal de la dieta.

GRAFICA V.- NIVEL DE DNA Y ACTIVIDAD DNASA EN CEREBRO

DNA

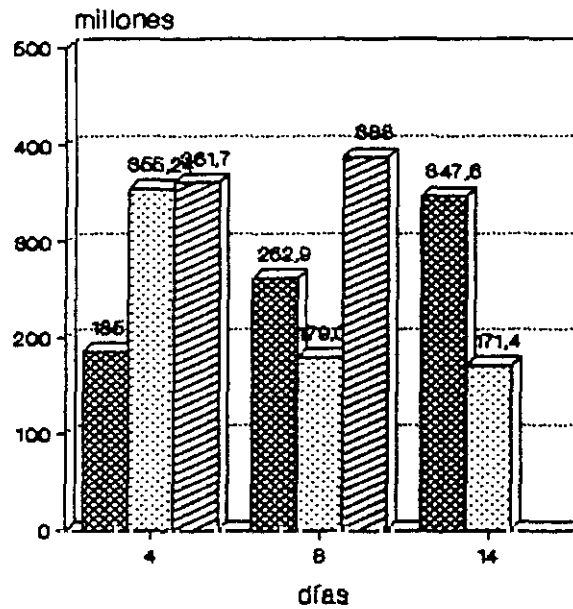


DNAsa



GRAFICA VI.- NUMERO DE NUCLEOS Y RELACION PROTEINA/DNA
(TAMANO CELULAR) EN CEREBRO

NUMERO DE NUCLEOS



PROTEINA/DNA

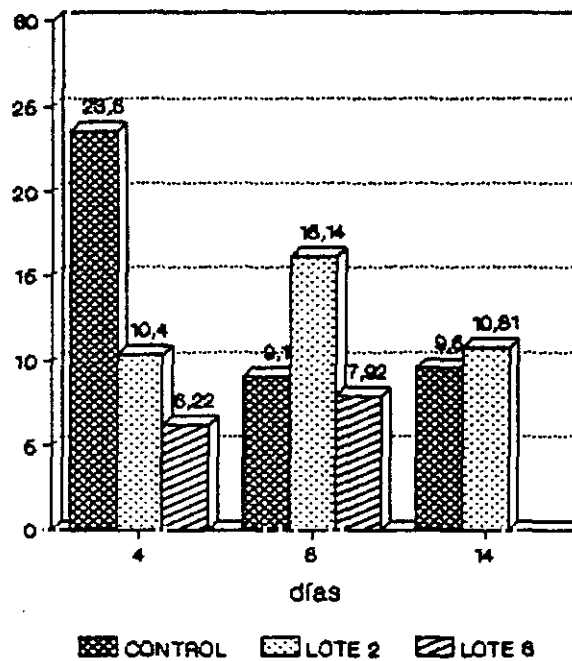


TABLA 9**RNA, RNA/DNA Y RNA/PROTEINA EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
RNA (mg/cerebro)			
CONTROL	5.03 ± 1.54 ^{a,1}	2.53 ± 0.57 ^{a,b,1}	4.75 ± 0.90 ^{a,1}
LOTE II	5.40 ± 0.94 ^{a,1}	1.37 ± 0.28 ^{b,2}	1.13 ± 0.36 ^{b,2}
LOTE III	2.99 ± 0.16 ^{a,1}	3.56 ± 0.68 ^{a,1}	---
RNA/DNA			
CONTROL	6.26 ± 3.42 ^{a,1}	2.72 ± 1.22 ^{a,1}	2.33 ± 0.52 ^{a,1}
LOTE II	2.50 ± 0.48 ^{a,1}	5.08 ± 3.64 ^{a,1}	1.21 ± 0.43 ^{a,1}
LOTE III	1.35 ± 0.09 ^{a,1}	1.52 ± 0.22 ^{a,1}	---
RNA/PROTEINA			
CONTROL	0.30 ± 0.08 ^{a,1}	0.13 ± 0.03 ^{a,b,1}	0.25 ± 0.05 ^{a,1}
LOTE II	0.24 ± 0.04 ^{a,1}	0.06 ± 0.02 ^{b,2}	0.12 ± 0.04 ^{a,2}
LOTE III	0.22 ± 0.02 ^{a,1}	0.21 ± 0.03 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 10**ACTIVIDAD RNASA ACIDA (U.I.) EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
RNASA/CEREBRO			
CONTROL	0.30 ± 0.03 ^{a,1}	0.46 ± 0.04 ^{a,1,2}	0.56 ± 0.06 ^{a,2}
LOTE 11	0.57 ± 0.03 ^{b,1}	0.57 ± 0.08 ^{a,1}	0.92 ± 0.09 ^{b,2}
LOTE 111	1.13 ± 0.07 ^{c,1}	1.40 ± 0.07 ^{b,1}	---
RNASA (1)/mg PROTEINA			
CONTROL	16.98 ± 1.20 ^{a,1}	23.11 ± 1.65 ^{a,1,2}	29.56 ± 3.98 ^{a,2}
LOTE 11	26.00 ± 2.47 ^{b,1}	24.95 ± 3.82 ^{a,1}	83.03 ± 4.88 ^{b,2}
LOTE 111	81.87 ± 3.19 ^{c,1}	84.44 ± 7.18 ^{b,1}	---
RNASA/RNA			
CONTROL	0.10 ± 0.04 ^{a,1}	0.23 ± 0.06 ^{a,1}	0.17 ± 0.07 ^{a,1}
LOTE 11	0.12 ± 0.02 ^{a,1}	0.47 ± 0.07 ^{a,1,2}	1.51 ± 0.56 ^{a,2}
LOTE 111	0.39 ± 0.04 ^{b,1}	0.46 ± 0.09 ^{a,1}	---
RNASA/DNA			
CONTROL	0.37 ± 0.10 ^{a,1}	0.79 ± 0.51 ^{a,1}	0.27 ± 0.02 ^{a,1}
LOTE 11	0.26 ± 0.02 ^{a,1}	2.48 ± 1.86 ^{a,1}	0.88 ± 0.08 ^{b,1}
LOTE 111	0.51 ± 0.05 ^{a,1}	0.66 ± 0.14 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

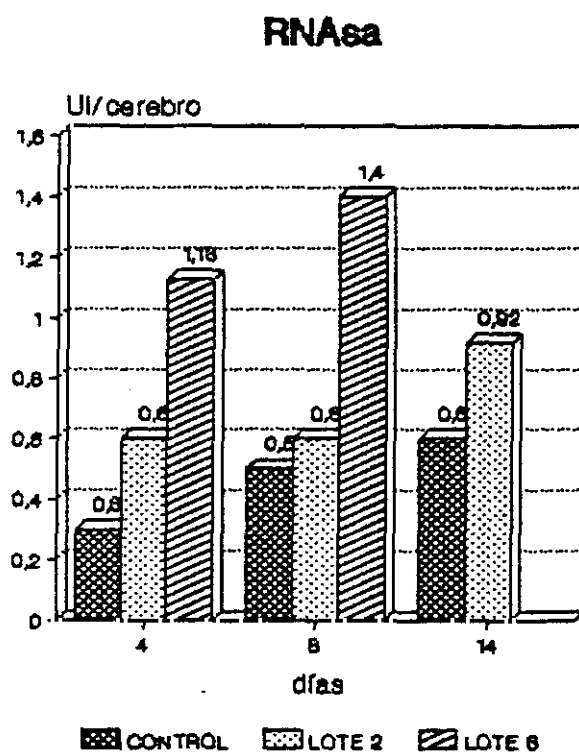
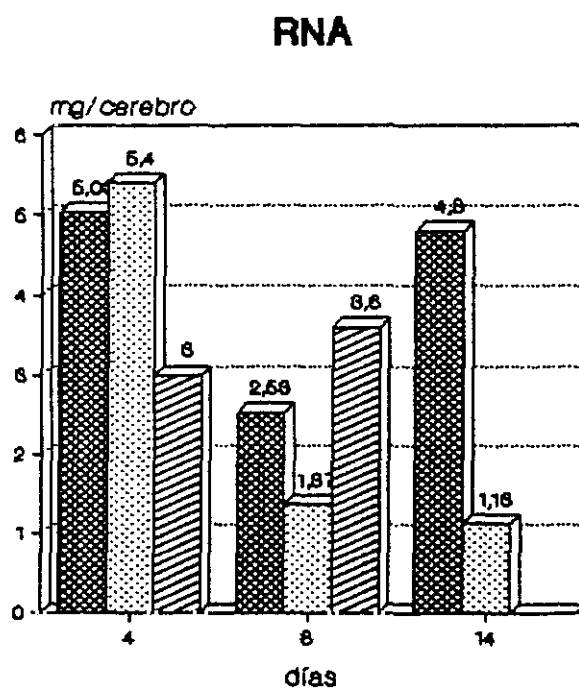
Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

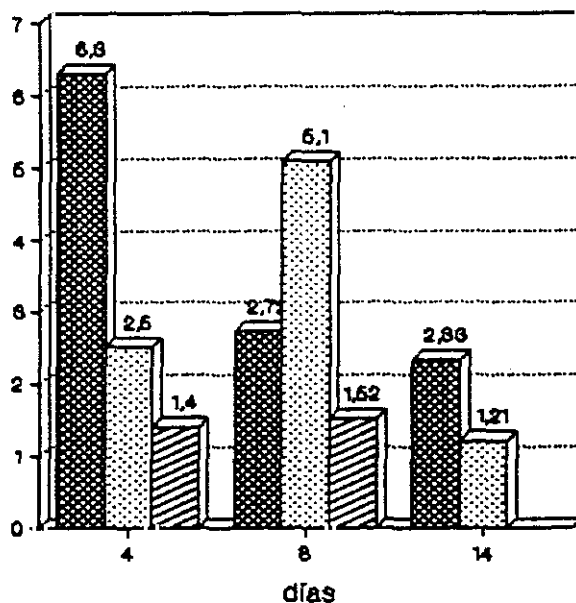
(1) mU.I.

GRAFICA VII.- NIVEL DE RNA Y ACTIVIDAD RNAsA EN CEREBRO



GRAFICA VIII.- RELACIONES RNA/DNA (NIVEL DE NUCLEOTIDO POR CELULA) Y RNA/PROTEINA (CAPACIDAD DE SINTESIS PROTEICA) EN CEREBRO

RNA/DNA



RNA/PROTEINA

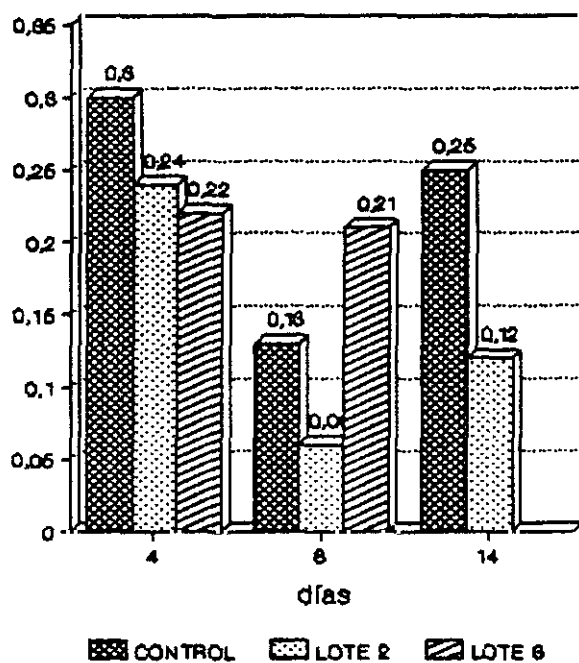


TABLA 11**ACTIVIDADES DE FOSFATASA ACIDA (U.I.) Y FOSFATASA ALCALINA (U.I.)****EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
FOSFATASA ACIDA /CEREBRO			
CONTROL	37.06 ± 5.47 ^{a,1}	41.38 ± 2.35 ^{a,1}	36.97 ± 3.12 ^{a,1}
LOTE 11	55.70 ± 2.03 ^{b,1}	53.06 ± 5.49 ^{a,b,1}	30.87 ± 3.05 ^{a,2}
LOTE 111	35.36 ± 1.44 ^{a,1}	64.30 ± 1.60 ^{b,2}	---
FOSFATASA ACIDA/ mg PROTEINA			
CONTROL	2.03 ± 0.15 ^{a,1}	2.11 ± 0.19 ^{a,1}	1.95 ± 0.25 ^{a,1}
LOTE 11	2.58 ± 0.32 ^{a,1}	2.68 ± 0.11 ^{a,1}	2.82 ± 0.31 ^{a,1}
LOTE 111	2.61 ± 0.25 ^{a,1}	3.84 ± 0.18 ^{b,2}	---
FOSFATASA ALCALINA/ CEREBRO			
CONTROL	18.96 ± 4.14 ^{a,1}	18.92 ± 4.39 ^{a,1}	16.71 ± 1.91 ^{a,1}
LOTE 11	31.74 ± 3.17 ^{b,1}	31.02 ± 2.54 ^{b,1}	10.55 ± 1.71 ^{a,2}
LOTE 111	17.96 ± 1.67 ^{a,1}	31.45 ± 1.51 ^{b,2}	---
FOSFATASA ALCALINA/ mg PROTEINA			
CONTROL	1.06 ± 0.19 ^{a,1}	0.98 ± 0.25 ^{a,1}	0.85 ± 0.06 ^{a,1}
LOTE 11	1.41 ± 0.13 ^{a,1}	1.63 ± 0.19 ^{a,b,1}	0.85 ± 0.08 ^{a,2}
LOTE 111	1.33 ± 0.17 ^{a,1}	1.91 ± 0.22 ^{b,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

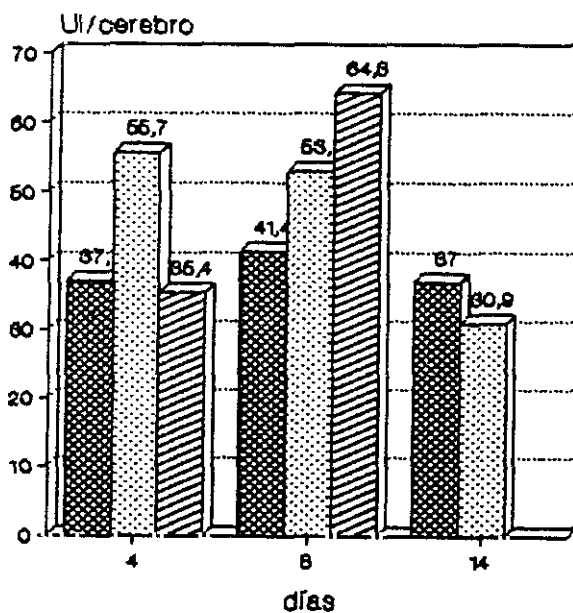
Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

GRAFICA IX.- ACTIVIDAD HIDROLASICA EN CEREBRO: FOSFATASAS ACIDA Y ALCALINA

FOSFATASA ACIDA



FOSFATASA ALCALINA

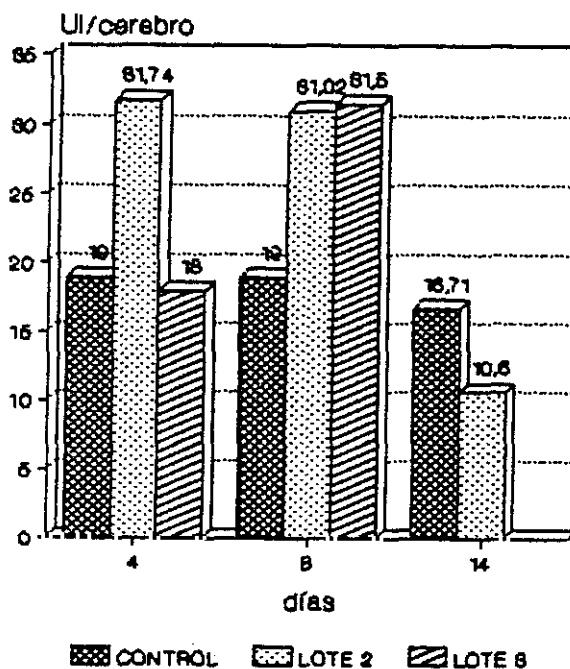


TABLA 12

ACTIVIDAD DE BETA-GLUCURONIDASA (U.I.) EN CEREBRO

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
BETA-GLUCURONIDASA/ CEREBRO			
CONTROL	2.09 ± 0.48 ^{a,1}	1.75 ± 0.18 ^{a,1}	2.57 ± 0.53 ^{a,1}
LOTE 11	3.13 ± 1.04 ^{a,1}	1.85 ± 0.24 ^{a,1}	2.01 ± 0.38 ^{a,1}
LOTE 111	1.70 ± 0.28 ^{a,1}	1.51 ± 0.21 ^{a,1}	---
BETA-GLUCURONIDASA/ mg PROTEINA			
CONTROL	0.12 ± 0.02 ^{a,1}	0.09 ± 0.01 ^{a,1}	0.14 ± 0.03 ^{a,1}
LOTE 11	0.13 ± 0.003 ^{a,1}	0.12 ± 0.003 ^{a,1}	0.11 ± 0.02 ^{a,1}
LOTE 111	0.09 ± 0.01 ^{a,1}	0.11 ± 0.02 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
(P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 13**ACTIVIDADES DE GPT Y GOT (U.I.) EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
GPT/CEREBRO			
CONTROL	$0.34 \pm 0.03^{a,1}$	$0.44 \pm 0.04^{a,1}$	$0.32 \pm 0.05^{a,1}$
LOTE II	$0.57 \pm 0.06^{b,1}$	$0.29 \pm 0.04^{b,2}$	$0.16 \pm 0.03^{b,2}$
LOTE III	$0.19 \pm 0.01^{c,1}$	$0.19 \pm 0.03^{b,1}$	---
GPT/mg PROTEINA			
CONTROL	$0.02 \pm 1 \cdot 10^{-3a,b,1}$	$0.02 \pm 1 \cdot 10^{-3a,1}$	$0.02 \pm 2 \cdot 10^{-3a,1}$
LOTE II	$0.03 \pm 3 \cdot 10^{-3a,1}$	$0.02 \pm 2 \cdot 10^{-3b,2}$	$0.01 \pm 1 \cdot 10^{-3a,2}$
LOTE III	$0.01 \pm 1 \cdot 10^{-3b,1}$	$0.01 \pm 1 \cdot 10^{-3b,1}$	---
GOT/CEREBRO			
CONTROL	$16.32 \pm 2.58^{a,1}$	$23.27 \pm 2.00^{a,1}$	$20.26 \pm 1.80^{a,1}$
LOTE II	$21.29 \pm 1.98^{a,1}$	$17.34 \pm 1.92^{a,1}$	$10.80 \pm 0.98^{b,2}$
LOTE III	$21.68 \pm 1.70^{a,1}$	$19.51 \pm 1.57^{a,1}$	---
GOT/mg PROTEINA			
CONTROL	$0.90 \pm 0.09^{a,1}$	$1.19 \pm 0.13^{a,1}$	$1.03 \pm 0.05^{a,1}$
LOTE II	$0.96 \pm 0.08^{a,1}$	$0.89 \pm 0.09^{a,1}$	$0.98 \pm 0.07^{a,1}$
LOTE III	$1.59 \pm 0.16^{b,1}$	$1.16 \pm 0.09^{a,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

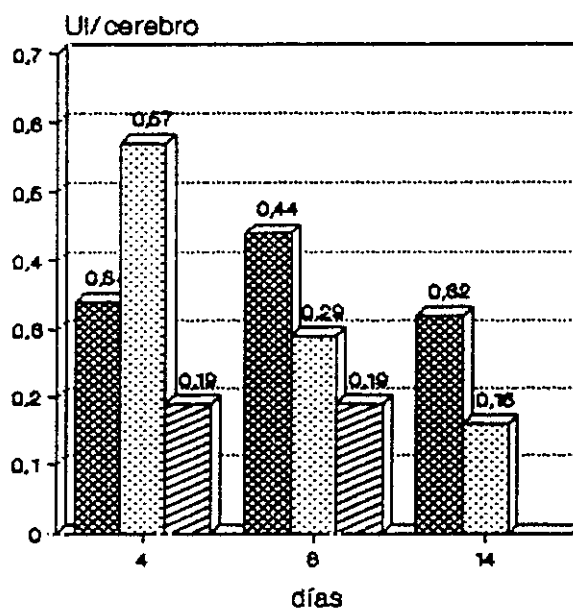
Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

GRAFICA X.- ACTIVIDAD TRANSAMINASICA EN CEREBRO: GPT Y GOT

GPT



GOT

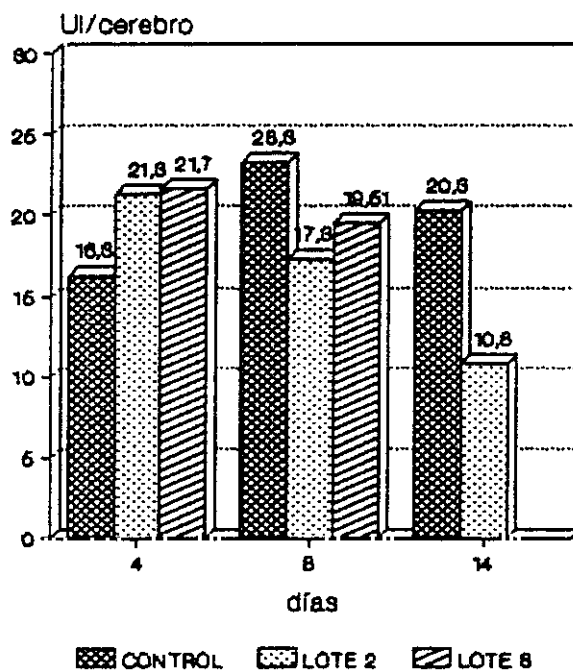


TABLA 14**AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ISOLEUCINA			
CONTROL	100.41 \pm 12.37 ^{a,1}	83.56 \pm 4.91 ^{a,1}	87.08 \pm 3.61 ^{a,1}
LOTE II	56.47 \pm 4.90 ^{b,1}	77.00 \pm 3.47 ^{a,2}	51.78 \pm 1.83 ^{b,1}
LOTE III	55.61 \pm 1.81 ^{b,1}	71.39 \pm 20.26 ^{a,1}	---
LEUCINA			
CONTROL	140.17 \pm 20.03 ^{a,1}	128.78 \pm 9.60 ^{a,1}	130.16 \pm 7.56 ^{a,1}
LOTE II	95.88 \pm 2.17 ^{a,b,1}	113.24 \pm 1.80 ^{a,2}	77.35 \pm 4.26 ^{b,3}
LOTE III	67.90 \pm 1.80 ^{b,1}	92.73 \pm 26.24 ^{a,1}	---
VALINA			
CONTROL	194.44 \pm 20.23 ^{a,1}	158.46 \pm 9.89 ^{a,1}	165.95 \pm 13.81 ^{a,1}
LOTE II	126.08 \pm 1.58 ^{b,1}	165.31 \pm 13.79 ^{a,2}	87.35 \pm 3.87 ^{b,3}
LOTE III	96.28 \pm 7.49 ^{b,1}	145.90 \pm 24.23 ^{a,1}	---
AAR (1)			
CONTROL	435.02 \pm 51.59 ^{a,1}	370.81 \pm 20.55 ^{a,1}	383.18 \pm 23.81 ^{a,1}
LOTE II	287.42 \pm 8.07 ^{b,1}	355.56 \pm 12.13 ^{a,2}	216.48 \pm 9.30 ^{b,3}
LOTE III	219.79 \pm 10.32 ^{b,1}	310.02 \pm 66.32 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) AAR = Ile + Leu + Val

TABLA 15a**AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ASPARTICO			
CONTROL	36.53 \pm 4.41 ^{a,1}	45.23 \pm 0.42 ^{a,1,2}	53.75 \pm 1.92 ^{a,2}
LOTE II	36.43 \pm 2.76 ^{a,1}	46.80 \pm 3.69 ^{a,1}	48.25 \pm 4.37 ^{a,1}
LOTE III	24.78 \pm 2.22 ^{a,1}	29.86 \pm 3.25 ^{b,1}	---
ASPARRAGINA			
CONTROL	76.71 \pm 5.12 ^{a,1}	76.10 \pm 3.97 ^{a,1}	46.95 \pm 2.03 ^{a,2}
LOTE II	45.02 \pm 1.91 ^{b,1,2}	53.03 \pm 3.12 ^{b,1}	37.06 \pm 1.40 ^{b,2}
LOTE III	30.72 \pm 1.14 ^{c,1}	39.28 \pm 4.42 ^{b,1}	---
GLUTAMICO			
CONTROL	95.24 \pm 7.12 ^{a,1}	144.03 \pm 14.40 ^{a,1}	211.78 \pm 30.04 ^{a,2}
LOTE II	86.20 \pm 2.65 ^{a,1}	156.66 \pm 12.48 ^{a,2}	462.06 \pm 10.39 ^{b,3}
LOTE III	46.30 \pm 0.99 ^{b,1}	82.25 \pm 5.93 ^{b,2}	---
GLUTAMINA			
CONTROL	1270.41 \pm 118.75 ^{a,1}	1203.92 \pm 30.75 ^{a,1}	1324.90 \pm 81.51 ^{a,1}
LOTE II	820.72 \pm 3.65 ^{b,1}	608.11 \pm 39.55 ^{b,2}	466.89 \pm 3.69 ^{b,3}
LOTE III	574.11 \pm 31.58 ^{b,1}	508.76 \pm 31.17 ^{b,1}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 15b**AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
SERINA			
CONTROL	439.64 \pm 35.31 ^{a,1}	225.69 \pm 14.78 ^{a,2}	200.56 \pm 4.72 ^{a,2}
LOTE II	641.18 \pm 62.12 ^{b,1}	830.55 \pm 13.65 ^{b,1}	1362.18 \pm 145.73 ^{b,2}
LOTE III	301.20 \pm 33.53 ^{a,1}	206.46 \pm 23.56 ^{a,1}	---
GLICINA			
CONTROL	244.46 \pm 7.30 ^{a,1}	197.01 \pm 18.97 ^{a,1}	228.30 \pm 6.99 ^{a,1}
LOTE II	903.74 \pm 31.08 ^{b,1}	725.25 \pm 41.19 ^{b,2}	620.10 \pm 15.37 ^{b,2}
LOTE III	468.85 \pm 34.12 ^{c,1}	320.94 \pm 16.87 ^{c,2}	---
TREONINA			
CONTROL	221.79 \pm 17.50 ^{a,1}	127.72 \pm 29.54 ^{a,2}	254.92 \pm 10.97 ^{a,1}
LOTE II	542.69 \pm 59.76 ^{b,1}	933.61 \pm 83.10 ^{b,2}	1262.19 \pm 92.00 ^{b,3}
LOTE III	265.55 \pm 26.80 ^{a,1}	282.09 \pm 18.61 ^{a,1}	---
ALANINA			
CONTROL	776.47 \pm 21.60 ^{a,1}	810.37 \pm 133.43 ^{a,1}	509.81 \pm 22.87 ^{a,1}
LOTE II	568.20 \pm 14.66 ^{b,1}	642.57 \pm 26.36 ^{a,2}	457.21 \pm 76.73 ^{a,1}
LOTE III	244.81 \pm 17.63 ^{c,1}	265.47 \pm 8.53 ^{b,1}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 16

AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
TIROSINA			
CONTROL	123.09 \pm 12.36 ^{a,1}	103.77 \pm 2.93 ^{a,1}	92.06 \pm 7.10 ^{a,1}
LOTE 11	90.96 \pm 4.66 ^{b,1}	84.67 \pm 1.88 ^{b,1}	48.63 \pm 8.91 ^{b,2}
LOTE 111	41.50 \pm 1.72 ^{c,1}	78.30 \pm 6.50 ^{b,2}	---
TRIPTOFANO			
CONTROL	112.31 \pm 13.12 ^{a,1}	96.28 \pm 5.79 ^{a,1}	90.39 \pm 0.93 ^{a,1}
LOTE 11	22.28 \pm 2.02 ^{b,1}	28.47 \pm 2.22 ^{b,1}	24.90 \pm 3.38 ^{b,1}
LOTE 111	25.59 \pm 3.37 ^{b,1}	23.15 \pm 2.64 ^{b,1}	---
FENILALANINA			
CONTROL	63.94 \pm 4.17 ^{a,1}	53.39 \pm 3.95 ^{a,1}	51.11 \pm 3.95 ^{a,1}
LOTE 11	41.75 \pm 4.79 ^{b,1}	46.45 \pm 2.65 ^{a,1}	36.19 \pm 2.05 ^{b,1}
LOTE 111	40.90 \pm 5.67 ^{b,1}	45.34 \pm 3.41 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 17

**SUMA DE AMINOACIDOS AROMATICOS, SUMA DE AMINOACIDOS NEUTROS
Y RELACION ENTRE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA
Y AMINOACIDOS AROMATICOS ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
AAA (1)			
CONTROL	187.03 \pm 14.52 ^{a,1}	157.16 \pm 5.47 ^{a,1}	143.17 \pm 11.04 ^{a,1}
LOTE II	132.71 \pm 6.10 ^{b,1}	131.12 \pm 1.22 ^{b,1}	84.82 \pm 10.80 ^{b,2}
LOTE III	82.40 \pm 6.02 ^{c,1}	123.64 \pm 9.76 ^{b,2}	---
AAN (2)			
CONTROL	622.04 \pm 65.35 ^{a,1}	527.97 \pm 22.86 ^{a,1}	526.35 \pm 30.17 ^{a,1}
LOTE II	411.13 \pm 13.81 ^{b,1}	486.68 \pm 13.09 ^{a,2}	301.30 \pm 19.26 ^{b,3}
LOTE III	302.19 \pm 9.93 ^{b,1}	433.67 \pm 75.10 ^{a,1}	---
AAR/AAA			
CONTROL	2.31 \pm 0.11 ^{a,1}	2.37 \pm 0.14 ^{a,1}	2.71 \pm 0.19 ^{a,1}
LOTE II	2.10 \pm 0.05 ^{a,1}	2.71 \pm 0.07 ^{a,1}	2.73 \pm 0.35 ^{a,1}
LOTE III	2.74 \pm 0.29 ^{a,1}	2.43 \pm 0.34 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) AAA = Tirosina + Fenilalanina.

(2) AAN = AAR + AAA.

TABLA 18

AMINOACIDOS BASICOS (1) LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ARGININA			
CONTROL	$33.97 \pm 2.69^{a,1}$	$38.09 \pm 2.00^{a,1,2}$	$43.73 \pm 0.44^{a,2}$
LOTE II	$25.51 \pm 2.00^{a,1}$	$54.54 \pm 3.30^{b,2}$	$13.77 \pm 0.38^{b,3}$
LOTE III	$22.64 \pm 4.03^{a,1}$	$21.40 \pm 2.08^{c,1}$	---
HISTIDINA			
CONTROL	$76.26 \pm 7.79^{a,1}$	$66.70 \pm 1.15^{a,1}$	$76.54 \pm 4.71^{a,1}$
LOTE II	$59.96 \pm 2.68^{a,1}$	$53.78 \pm 3.50^{b,1}$	$12.20 \pm 0.14^{b,2}$
LOTE III	$36.53 \pm 1.79^{b,1}$	$30.77 \pm 1.88^{c,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye la lisina.

TABLA 19

AMINOACIDOS AZUFRADOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
METIONINA			
CONTROL	67.14 \pm 5.20 ^{a,1}	59.27 \pm 8.27 ^{a,1}	58.50 \pm 0.60 ^{a,1}
LOTE 11	62.52 \pm 0.78 ^{a,1}	60.66 \pm 5.34 ^{a,1}	58.62 \pm 0.92 ^{a,1}
LOTE 111	52.04 \pm 4.05 ^{a,1}	67.89 \pm 7.72 ^{a,1}	---
TAURINA			
CONTROL	156.90 \pm 17.62 ^{a,1}	133.41 \pm 5.91 ^{a,1}	292.54 \pm 20.95 ^{a,2}
LOTE 11	100.25 \pm 10.89 ^{a,1}	194.45 \pm 15.01 ^{b,2}	135.41 \pm 22.49 ^{b,1,2}
LOTE 111	176.73 \pm 35.75 ^{a,1}	134.87 \pm 5.09 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye la lisina.

TABLA 20

**SUMA DE AMINOACIDOS ESENCIALES, SUMA DE AMINOACIDOS
NO ESENCIALES, RELACION ENTRE AMBOS Y SUMA DE AMINOACIDOS**

TOTALES LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
AAE (1)			
CONTROL	830.98 \pm 73.61 ^{a,1}	656.72 \pm 34.40 ^{a,1}	809.48 \pm 35.19 ^{a,1}
LOTE II	948.33 \pm 63.39 ^{a,1}	1443.93 \pm 75.86 ^{b,2}	1540.83 \pm 94.34 ^{b,2}
LOTE III	585.41 \pm 36.43 ^{b,1}	689.63 \pm 52.72 ^{a,1}	---
AANE (2)			
CONTROL	2985.84 \pm 175.67 ^{a,1}	2730.01 \pm 159.20 ^{a,1}	2621.17 \pm 146.60 ^{a,1}
LOTE II	3147.41 \pm 106.04 ^{a,1}	3394.61 \pm 49.02 ^{b,1}	3465.32 \pm 226.80 ^{a,1}
LOTE III	1701.55 \pm 78.27 ^{b,1}	1492.04 \pm 61.36 ^{c,1}	---
AAE/AANE			
CONTROL	0.28 \pm 0.01 ^{a,1,2}	0.24 \pm 0.02 ^{a,2}	0.31 \pm 0.02 ^{a,1}
LOTE II	0.30 \pm 0.01 ^{b,1}	0.43 \pm 0.03 ^{b,2}	0.45 \pm 0.01 ^{b,2}
LOTE III	0.34 \pm 0.01 ^{b,1}	0.47 \pm 0.05 ^{b,1}	---
AAT (3)			
CONTROL	3861.81 \pm 246.08 ^{a,1}	3386.73 \pm 170.47 ^{a,1}	3430.65 \pm 159.12 ^{a,1}
LOTE II	4095.74 \pm 159.70 ^{a,1}	4838.54 \pm 45.48 ^{b,1,2}	5006.15 \pm 320.00 ^{b,2}
LOTE III	2286.96 \pm 109.32 ^{b,1}	2181.67 \pm 64.15 ^{c,1}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) AAE = Arg + His + Ile + Leu + Phe + Thr + Val

(2) AANE = Ala + Asp + Glu + Gln + Gly + Ser + Tyr

(3) AAT = AAE + AANE

TABLA 21**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ISOLEUCINA/ AAN-ISOLEUCINA			
CONTROL	$0.19 \pm 0.003^{a,1}$	$0.19 \pm 0.01^{a,1}$	$0.20 \pm 0.004^{a,1}$
LOTE 11	$0.16 \pm 0.01^{b,1}$	$0.19 \pm 0.01^{a,1,2}$	$0.21 \pm 0.01^{a,2}$
LOTE 111	$0.23 \pm 0.01^{c,1}$	$0.19 \pm 0.04^{a,1}$	---
LEUCINA/ AAN-LEUCINA			
CONTROL	$0.29 \pm 0.02^{a,1}$	$0.32 \pm 0.02^{a,1}$	$0.33 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 11	$0.30 \pm 0.01^{a,1}$	$0.30 \pm 0.01^{a,1}$	$0.35 \pm 0.02^{a,1}$
LOTE 111	$0.29 \pm 0.01^{a,1}$	$0.26 \pm 0.04^{a,1}$	---
VALINA/ AAN-VALINA			
CONTROL	$0.46 \pm 0.01^{a,1}$	$0.43 \pm 0.02^{a,1}$	$0.46 \pm 0.03^{a,1}$
LOTE 11	$0.44 \pm 0.01^{a,1}$	$0.51 \pm 0.04^{a,1}$	$0.41 \pm 0.02^{a,1}$
LOTE 111	$0.47 \pm 0.04^{a,1}$	$0.53 \pm 0.08^{a,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 22**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
FENILALANINA/ AAN-FENILALANINA			
CONTROL	$0.12 \pm 0.01^{a,1}$	$0.11 \pm 0.01^{a,1}$	$0.11 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 11	$0.11 \pm 0.01^{a,1,2}$	$0.11 \pm 0.01^{a,1}$	$0.14 \pm 0.01^{b,2}$
LOTE 111	$0.16 \pm 0.02^{a,1}$	$0.13 \pm 0.01^{a,1}$	---
TIROSINA/ AAN-TIROSINA			
CONTROL	$0.25 \pm 0.02^{a,1}$	$0.25 \pm 0.01^{a,1}$	$0.21 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 11	$0.29 \pm 0.02^{a,1}$	$0.21 \pm 0.01^{a,1,2}$	$0.19 \pm 0.03^{a,2}$
LOTE 111	$0.16 \pm 0.01^{b,1}$	$0.24 \pm 0.03^{a,1}$	---
FENILALANINA/ TIROSINA			
CONTROL	$0.54 \pm 0.07^{a,1}$	$0.51 \pm 0.01^{a,1}$	$0.56 \pm 0.003^{a,1}$
LOTE 11	$0.46 \pm 0.06^{a,1}$	$0.55 \pm 0.04^{a,1}$	$0.90 \pm 0.22^{a,1}$
LOTE 111	$0.99 \pm 0.14^{b,1}$	$0.58 \pm 0.02^{a,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 23**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ALANINA/ TIROSINA			
CONTROL	$6.60 \pm 0.77^{a,1}$	$7.76 \pm 1.16^{a,1}$	$5.59 \pm 0.23^{a,1}$
LOTE 11	$6.30 \pm 0.34^{a,1}$	$11.17 \pm 0.50^{b,1}$	$12.76 \pm 4.68^{a,1}$
LOTE 111	$5.96 \pm 0.57^{a,1}$	$3.52 \pm 0.40^{c,2}$	---
ALANINA/ LEUCINA			
CONTROL	$5.86 \pm 0.56^{a,1,2}$	$6.18 \pm 0.67^{a,b,1}$	$3.93 \pm 0.13^{a,2}$
LOTE 11	$5.94 \pm 0.27^{a,1}$	$8.34 \pm 0.34^{a,1}$	$5.93 \pm 0.93^{a,1}$
LOTE 111	$3.62 \pm 0.29^{b,1}$	$3.99 \pm 1.08^{b,1}$	---
ALANINA/ AAR			
CONTROL	$1.86 \pm 0.16^{a,1,2}$	$2.14 \pm 0.24^{a,1}$	$1.34 \pm 0.06^{a,2}$
LOTE 11	$2.05 \pm 0.12^{a,1}$	$2.67 \pm 0.14^{a,1}$	$2.12 \pm 0.34^{a,1}$
LOTE 111	$1.21 \pm 0.09^{b,1}$	$1.02 \pm 0.20^{b,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 24**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
SER+GLI+ALA/AAR			
CONTROL	$3.48 \pm 0.29^{a,1}$	$3.29 \pm 0.24^{a,1,2}$	$2.47 \pm 0.13^{a,2}$
LOTE II	$7.62 \pm 0.49^{b,1}$	$7.07 \pm 0.31^{b,1}$	$11.28 \pm 0.88^{b,2}$
LOTE III	$4.62 \pm 0.21^{a,1}$	$3.05 \pm 0.59^{a,1}$	---
GLICINA/VALINA			
CONTROL	$1.31 \pm 0.15^{a,1}$	$1.28 \pm 0.18^{a,1}$	$1.41 \pm 0.14^{a,1}$
LOTE II	$7.17 \pm 0.23^{b,1}$	$4.52 \pm 0.49^{b,2}$	$7.16 \pm 0.38^{b,1}$
LOTE III	$4.94 \pm 0.04^{c,1}$	$2.46 \pm 0.40^{a,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 25

AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ISOLEUCINA			
CONTROL	42.11 \pm 1.71 ^{a,1}	55.09 \pm 4.12 ^{a,2}	64.70 \pm 3.46 ^{a,2}
LOTE II	33.86 \pm 4.49 ^{a,1}	41.27 \pm 3.70 ^{a,1}	47.21 \pm 1.64 ^{b,1}
LOTE III	33.56 \pm 1.83 ^{a,1}	100.19 \pm 4.39 ^{b,2}	---
LEUCINA			
CONTROL	51.03 \pm 1.69 ^{a,1}	62.21 \pm 4.34 ^{a,1}	77.27 \pm 2.64 ^{a,2}
LOTE II	52.60 \pm 5.92 ^{a,1}	76.75 \pm 4.00 ^{a,2}	67.53 \pm 3.59 ^{a,1,2}
LOTE III	39.42 \pm 1.11 ^{a,1}	169.02 \pm 5.96 ^{b,2}	---
VALINA			
CONTROL	114.60 \pm 3.43 ^{a,1}	107.20 \pm 8.58 ^{a,1}	122.37 \pm 8.05 ^{a,1}
LOTE II	64.86 \pm 4.28 ^{b,1}	102.65 \pm 6.05 ^{a,2}	90.00 \pm 4.59 ^{b,2}
LOTE III	57.54 \pm 1.70 ^{b,1}	169.31 \pm 5.98 ^{b,2}	---
AAR (1)			
CONTROL	207.74 \pm 4.78 ^{a,1}	224.50 \pm 14.38 ^{a,1}	264.34 \pm 10.70 ^{a,2}
LOTE II	151.32 \pm 14.26 ^{b,1}	220.68 \pm 11.80 ^{a,2}	204.74 \pm 8.77 ^{b,2}
LOTE III	130.52 \pm 0.42 ^{b,1}	438.53 \pm 15.74 ^{b,2}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) AAR = Ile + Leu + Val.

TABLA 26a**AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)****EN GLOBULOS ROJOS**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ASPARTICO			
CONTROL	36.44 \pm 1.99 ^{a,1}	48.65 \pm 2.15 ^{a,2}	55.53 \pm 1.53 ^{a,2}
LOTE II	46.78 \pm 1.89 ^{b,1}	26.48 \pm 0.96 ^{b,2}	21.58 \pm 1.54 ^{b,2}
LOTE III	27.89 \pm 0.92 ^{c,1}	63.11 \pm 4.20 ^{c,2}	---
ASPARRAGINA			
CONTROL	89.48 \pm 2.46 ^{a,1}	75.67 \pm 2.04 ^{a,2}	73.02 \pm 3.18 ^{a,2}
LOTE II	48.08 \pm 2.26 ^{b,1}	59.92 \pm 6.36 ^{a,1}	48.43 \pm 4.70 ^{b,1}
LOTE III	36.37 \pm 0.90 ^{c,1}	118.38 \pm 10.32 ^{b,2}	---
GLUTAMICO			
CONTROL	585.12 \pm 22.01 ^{a,1}	667.91 \pm 28.62 ^{a,1}	482.95 \pm 18.01 ^{a,2}
LOTE II	623.17 \pm 6.91 ^{a,1}	1112.57 \pm 22.66 ^{b,2}	961.04 \pm 69.95 ^{b,2}
LOTE III	585.27 \pm 13.99 ^{a,1}	719.33 \pm 30.47 ^{a,2}	---
GLUTAMINA			
CONTROL	731.94 \pm 7.58 ^{a,1}	1229.41 \pm 74.68 ^{a,2}	1249.33 \pm 8.70 ^{a,2}
LOTE II	1109.49 \pm 59.04 ^{b,1}	750.15 \pm 136.47 ^{b,1}	841.33 \pm 103.16 ^{b,1}
LOTE III	1269.06 \pm 154.08 ^{b,1}	1228.35 \pm 90.08 ^{a,1}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 26b**AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)****EN GLOBULOS ROJOS**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
SERINA			
CONTROL	122.66 \pm 7.83 ^{a,1}	118.22 \pm 12.01 ^{a,1}	131.75 \pm 9.14 ^{a,1}
LOTE II	250.95 \pm 28.55 ^{b,1}	841.41 \pm 48.63 ^{b,2}	1043.53 \pm 128.01 ^{b,2}
LOTE III	140.47 \pm 3.65 ^{a,1}	284.05 \pm 28.32 ^{c,2}	---
GLICINA			
CONTROL	221.95 \pm 10.57 ^{a,1}	169.87 \pm 10.56 ^{a,2}	208.75 \pm 13.57 ^{a,1,2}
LOTE II	610.66 \pm 89.31 ^{b,1}	497.61 \pm 2.87 ^{b,1}	396.92 \pm 48.00 ^{b,1}
LOTE III	317.75 \pm 14.93 ^{a,1}	374.66 \pm 31.37 ^{c,1}	---
TREONINA			
CONTROL	128.55 \pm 2.00 ^{a,1}	114.45 \pm 6.99 ^{a,1}	217.26 \pm 2.27 ^{a,2}
LOTE II	282.68 \pm 42.59 ^{b,1}	555.82 \pm 21.13 ^{b,2}	792.43 \pm 14.43 ^{b,3}
LOTE III	154.52 \pm 10.53 ^{a,1}	308.80 \pm 27.54 ^{c,2}	---
ALANINA			
CONTROL	356.88 \pm 26.09 ^{a,1}	383.16 \pm 32.93 ^{a,1}	358.27 \pm 17.91 ^{a,1}
LOTE II	259.75 \pm 13.43 ^{b,1}	332.44 \pm 21.73 ^{a,1}	325.95 \pm 20.61 ^{a,1}
LOTE III	212.33 \pm 7.30 ^{b,1}	300.28 \pm 5.89 ^{a,2}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 27**AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN****GLOBULOS ROJOS**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
TIROSINA			
CONTROL	$82.82 \pm 0.58^{a,1}$	$105.17 \pm 2.91^{a,2}$	$103.71 \pm 1.96^{a,2}$
LOTE 11	$67.03 \pm 0.05^{b,1}$	$103.98 \pm 4.61^{a,2}$	$113.66 \pm 9.08^{a,2}$
LOTE 111	$75.68 \pm 5.59^{a,b,1}$	$161.34 \pm 10.10^{b,2}$	---
TRIPTOFANO			
CONTROL	$70.08 \pm 4.95^{a,1}$	$138.28 \pm 13.17^{a,2}$	$100.70 \pm 2.62^{a,3}$
LOTE 11	$36.06 \pm 0.34^{b,1}$	$22.74 \pm 1.93^{b,2}$	$62.88 \pm 5.18^{b,3}$
LOTE 111	$36.33 \pm 1.31^{b,1}$	$169.18 \pm 8.92^{a,2}$	---
FENILALANINA			
CONTROL	$28.59 \pm 3.41^{a,1}$	$30.97 \pm 4.06^{a,1}$	$30.78 \pm 2.81^{a,1}$
LOTE 11	$17.27 \pm 0.26^{b,1}$	$31.95 \pm 1.80^{a,2}$	$27.37 \pm 0.26^{a,3}$
LOTE 111	$26.12 \pm 0.14^{a,1}$	$86.94 \pm 3.97^{b,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 28

**SUMA DE AMINOACIDOS AROMATICOS, SUMA DE AMINOACIDOS
NEUTROS Y RELACION ENTRE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y
AMINOACIDOS AROMATICOS ($\mu\text{mol/l}$) EN GLOBULOS ROJOS**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
AAA (1)			
CONTROL	111.41 \pm 3.23 ^{a,1}	136.13 \pm 6.66 ^{a,2}	134.49 \pm 3.23 ^{a,2}
LOTE II	84.30 \pm 0.31 ^{b,1}	135.93 \pm 5.46 ^{a,2}	141.03 \pm 9.04 ^{a,2}
LOTE III	101.80 \pm 5.47 ^{a,1}	248.28 \pm 6.31 ^{b,2}	---
AAN (2)			
CONTROL	319.15 \pm 7.54 ^{a,1}	360.63 \pm 20.29 ^{a,1,2}	398.83 \pm 13.80 ^{a,2}
LOTE II	235.62 \pm 14.18 ^{b,1}	356.61 \pm 14.71 ^{a,2}	345.77 \pm 16.61 ^{a,2}
LOTE III	232.32 \pm 5.34 ^{b,1}	686.81 \pm 20.83 ^{b,2}	---
AAR/AAA			
CONTROL	1.87 \pm 0.03 ^{a,1}	1.65 \pm 0.06 ^{a,2}	1.96 \pm 0.04 ^{a,1}
LOTE II	1.80 \pm 0.17 ^{a,1}	1.63 \pm 0.08 ^{a,1}	1.47 \pm 0.06 ^{b,1}
LOTE III	1.30 \pm 0.07 ^{b,1}	1.77 \pm 0.04 ^{a,2}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) AAA = Tirosina + Fenilalanina

(2) AAN = AAR + AAA

TABLA 29

AMINOACIDOS BASICOS (1) LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN

GLOBULOS ROJOS

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ARGININA			
CONTROL	$34.45 \pm 1.57^{a,1}$	$37.52 \pm 0.26^{a,1}$	$58.25 \pm 5.59^{a,2}$
LOTE II	$53.89 \pm 8.50^{a,b,1}$	$76.03 \pm 0.56^{b,1}$	$68.97 \pm 9.26^{a,1}$
LOTE III	$57.17 \pm 3.56^{b,1}$	$134.27 \pm 12.44^{c,2}$	---
HISTIDINA			
CONTROL	$560.88 \pm 5.81^{a,1}$	$942.09 \pm 57.23^{a,1}$	$957.35 \pm 6.67^{a,2}$
LOTE II	$850.16 \pm 45.25^{b,1}$	$650.23 \pm 118.29^{b,1}$	$569.32 \pm 69.81^{b,1}$
LOTE III	$435.10 \pm 52.83^{a,1}$	$421.14 \pm 30.88^{b,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas

($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas

($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye la lisina.

TABLA 30

**SUMA DE AMINOACIDOS ESENCIALES, SUMA DE AMINOACIDOS
NO ESENCIALES, RELACION ENTRE AMBOS Y SUMA DE AMINOACIDOS
TOTALES LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN GLOBULOS ROJOS**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
AAE (1)			
CONTROL	960.21 \pm 4.80 ^{a,1}	1349.53 \pm 78.27 ^{a,2}	1527.98 \pm 16.31 ^{a,3}
LOTE 11	1355.32 \pm 68.90 ^{b,1}	1534.71 \pm 131.02 ^{a,1}	1662.82 \pm 69.14 ^{a,1}
LOTE 111	803.43 \pm 49.37 ^{a,1}	1389.67 \pm 32.98 ^{a,2}	---
AANE (2)			
CONTROL	2137.82 \pm 10.57 ^{a,1}	2722.38 \pm 143.48 ^{a,2}	2590.29 \pm 44.53 ^{a,2}
LOTE 11	2967.83 \pm 98.06 ^{b,1}	3664.64 \pm 176.19 ^{b,2}	3704.02 \pm 166.98 ^{b,2}
LOTE 111	2628.45 \pm 157.16 ^{b,1}	3131.13 \pm 76.19 ^{a,2}	---
AAE/AANE			
CONTROL	0.45 \pm 0.003 ^{a,1}	0.50 \pm 0.01 ^{a,2}	0.59 \pm 0.01 ^{a,3}
LOTE 11	0.46 \pm 0.01 ^{a,1}	0.42 \pm 0.02 ^{b,1}	0.45 \pm 0.02 ^{b,1}
LOTE 111	0.31 \pm 0.004 ^{b,1}	0.44 \pm 0.01 ^{b,2}	---
AAT (3)			
CONTROL	3098.03 \pm 12.16 ^{a,1}	4071.91 \pm 218.20 ^{a,2}	4118.28 \pm 58.13 ^{a,2}
LOTE 11	4323.15 \pm 159.86 ^{b,1}	5199.35 \pm 306.08 ^{b,2}	5366.84 \pm 195.54 ^{b,2}
LOTE 111	3431.88 \pm 205.80 ^{a,1}	4520.80 \pm 104.85 ^{a,b,2}	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) AAE = Arg + His + Ile + Leu + Phe + Thr + Val

(2) AANE = Ala + Asp + Glu + Gln + Gly + Ser + Tyr

(3) AAT = AAE + AANE

TABLA 31

**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN
GLOBULOS ROJOS**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ISOLEUCINA/ AAN-ISOLEUCINA			
CONTROL	$0.15 \pm 0.005^{a,1}$	$0.18 \pm 0.005^{a,2}$	$0.19 \pm 0.006^{a,2}$
LOTE 11	$0.17 \pm 0.01^{a,1}$	$0.13 \pm 0.01^{b,1}$	$0.16 \pm 0.004^{b,1}$
LOTE 111	$0.17 \pm 0.006^{a,1}$	$0.17 \pm 0.003^{a,1}$	---
LEUCINA/ AAN-LEUCINA			
CONTROL	$0.19 \pm 0.01^{a,1}$	$0.21 \pm 0.02^{a,1}$	$0.24 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 11	$0.28 \pm 0.02^{b,1}$	$0.27 \pm 0.01^{b,1}$	$0.24 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 111	$0.21 \pm 0.01^{a,1}$	$0.33 \pm 0.01^{c,2}$	---
VALINA/ AAN-VALINA			
CONTROL	$0.56 \pm 0.01^{a,1}$	$0.42 \pm 0.02^{a,2}$	$0.44 \pm 0.02^{a,2}$
LOTE 11	$0.38 \pm 0.01^{b,1,2}$	$0.40 \pm 0.01^{a,1}$	$0.35 \pm 0.004^{b,2}$
LOTE 111	$0.33 \pm 0.02^{b,1}$	$0.33 \pm 0.003^{b,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 32

**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN
GLOBULOS ROJOS**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
FENILALANINA/ AAN-FENILALANINA			
CONTROL	$0.10 \pm 0.01^{a,1}$	$0.09 \pm 0.01^{a,1}$	$0.08 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 11	$0.08 \pm 0.01^{a,1}$	$0.10 \pm 0.003^{a,1}$	$0.09 \pm 0.004^{a,1,2}$
LOTE 111	$0.13 \pm 0.003^{b,1}$	$0.15 \pm 0.01^{b,1}$	---
TIROSINA/ AAN-TIROSINA			
CONTROL	$0.35 \pm 0.01^{a,1}$	$0.42 \pm 0.02^{a,1}$	$0.35 \pm 0.02^{a,1}$
LOTE 11	$0.41 \pm 0.03^{a,b,1}$	$0.41 \pm 0.02^{a,1}$	$0.49 \pm 0.03^{b,1}$
LOTE 111	$0.48 \pm 0.04^{b,1}$	$0.31 \pm 0.02^{b,2}$	---
FENILALANINA/ TIROSINA			
CONTROL	$0.35 \pm 0.04^{a,1}$	$0.29 \pm 0.03^{a,1}$	$0.30 \pm 0.03^{a,1}$
LOTE 11	$0.26 \pm 0.003^{a,1,2}$	$0.31 \pm 0.02^{a,1}$	$0.25 \pm 0.02^{a,2}$
LOTE 111	$0.35 \pm 0.03^{a,1}$	$0.56 \pm 0.07^{b,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 33**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN****GLOBULOS ROJOS**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ALANINA/ TIROSINA			
CONTROL	$4.30 \pm 0.29^{a,1}$	$3.62 \pm 0.23^{a,1}$	$3.45 \pm 0.12^{a,1}$
LOTE II	$3.88 \pm 0.20^{a,1}$	$3.25 \pm 0.33^{a,1}$	$2.93 \pm 0.28^{a,1}$
LOTE III	$2.84 \pm 0.12^{b,1}$	$1.89 \pm 0.12^{b,2}$	---
ALANINA/ LEUCINA			
CONTROL	$6.98 \pm 0.39^{a,1}$	$6.20 \pm 0.50^{a,1}$	$4.63 \pm 0.13^{a,1}$
LOTE II	$5.09 \pm 0.38^{b,1}$	$4.40 \pm 0.43^{b,1}$	$4.82 \pm 0.06^{a,1}$
LOTE III	$5.42 \pm 0.30^{b,1}$	$1.78 \pm 0.03^{c,2}$	---
ALANINA/ AAR			
CONTROL	$1.71 \pm 0.09^{a,1}$	$1.70 \pm 0.07^{a,1}$	$1.36 \pm 0.08^{a,2}$
LOTE II	$1.74 \pm 0.08^{a,1}$	$1.52 \pm 0.14^{a,1}$	$1.59 \pm 0.07^{a,1}$
LOTE III	$1.63 \pm 0.06^{a,1}$	$0.69 \pm 0.01^{b,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 34

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN

GLOBULOS ROJOS

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
SER+GLI+ALA/AAR			
CONTROL	$3.37 \pm 0.12^{a,1}$	$2.99 \pm 0.15^{a,1,2}$	$2.65 \pm 0.10^{a,2}$
LOTE II	$7.37 \pm 0.20^{b,1}$	$7.64 \pm 0.42^{b,1}$	$8.64 \pm 0.79^{b,1}$
LOTE III	$5.14 \pm 0.10^{c,1}$	$2.19 \pm 0.12^{a,2}$	---
GLICINA/VALINA			
CONTROL	$193 \pm 0.03^{a,1}$	$1.60 \pm 0.09^{a,1}$	$1.74 \pm 0.16^{a,1}$
LOTE II	$9.33 \pm 1.11^{b,1}$	$4.91 \pm 0.25^{b,2}$	$4.51 \pm 0.64^{b,2}$
LOTE III	$5.51 \pm 0.11^{c,1}$	$2.22 \pm 0.18^{a,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas

($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas

($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 35**AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)****EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ISOLEUCINA			
CONTROL	$0.28 \pm 0.04^{a,1}$	$0.13 \pm 0.004^{a,2}$	$0.39 \pm 0.04^{a,1}$
LOTE 11	$0.54 \pm 0.05^{b,1}$	$0.17 \pm 0.01^{a,b,2}$	$0.44 \pm 0.09^{a,1}$
LOTE 111	$0.50 \pm 0.04^{b,1}$	$0.20 \pm 0.02^{b,2}$	---
LEUCINA			
CONTROL	$0.57 \pm 0.13^{a,1,2}$	$0.24 \pm 0.01^{a,1}$	$0.65 \pm 0.12^{a,2}$
LOTE 11	$0.82 \pm 0.04^{a,b,1}$	$0.22 \pm 0.02^{a,1}$	$0.73 \pm 0.13^{a,2}$
LOTE 111	$1.02 \pm 0.10^{b,1}$	$0.29 \pm 0.05^{a,2}$	---
VALINA			
CONTROL	$0.37 \pm 0.09^{a,1,2}$	$0.19 \pm 0.02^{a,1}$	$0.57 \pm 0.07^{a,2}$
LOTE 11	$0.69 \pm 0.03^{b,1}$	$0.27 \pm 0.02^{a,1}$	$0.63 \pm 0.12^{a,2}$
LOTE 111	$0.78 \pm 0.08^{b,1}$	$0.29 \pm 0.04^{a,2}$	---
AAR (1)			
CONTROL	$1.21 \pm 0.26^{a,1,2}$	$0.55 \pm 0.03^{a,1}$	$1.60 \pm 0.21^{a,2}$
LOTE 11	$2.06 \pm 0.10^{b,1}$	$0.67 \pm 0.02^{a,2}$	$1.81 \pm 0.34^{a,1}$
LOTE 111	$2.30 \pm 0.22^{b,1}$	$0.78 \pm 0.11^{a,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) AAR = Ile + Leu + Val.

GRAFICA XI.- SUMA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

AAR

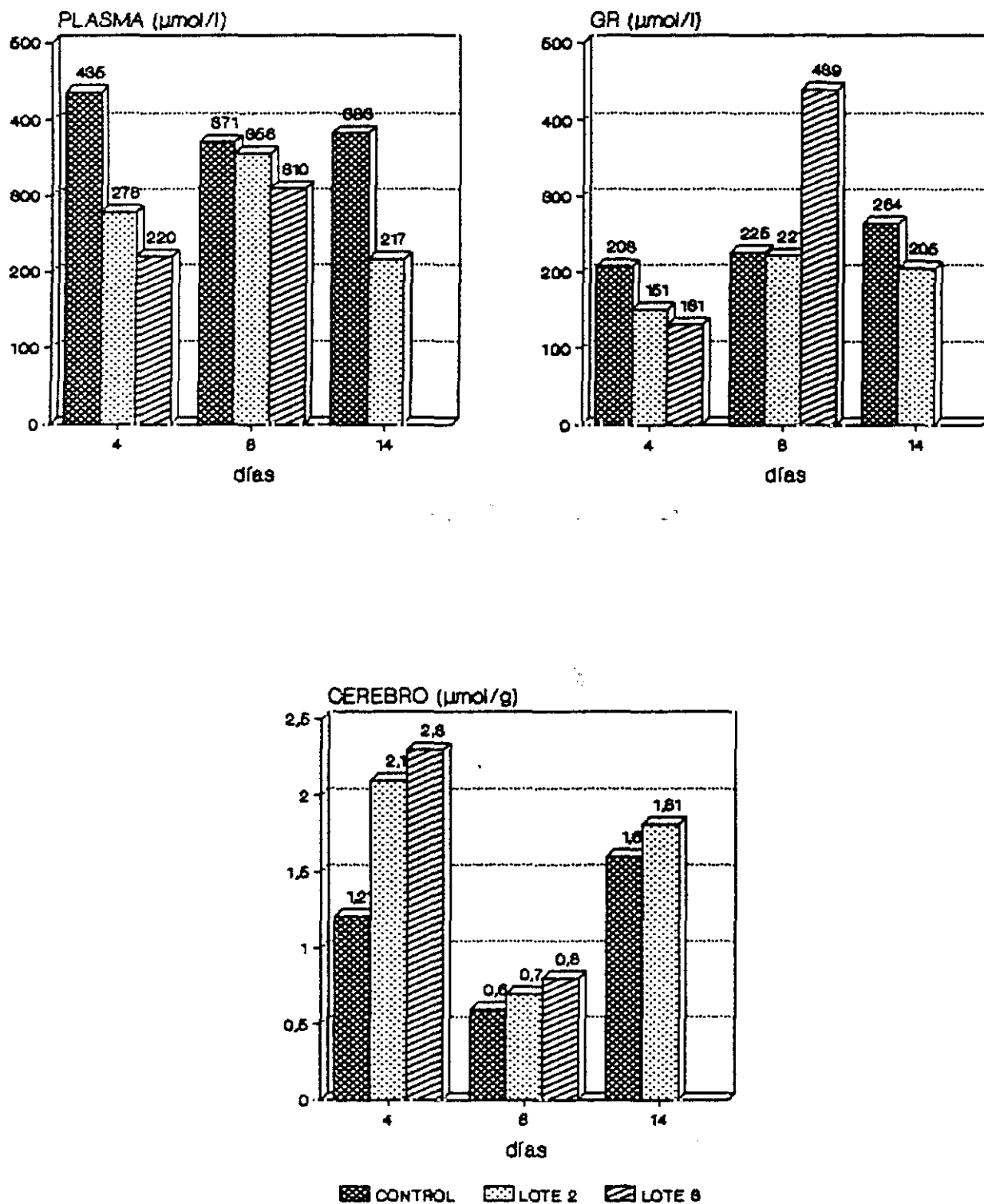


TABLA 36a**AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)****EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ASPARTICO			
CONTROL	$9.55 \pm 1.28^{a,1}$	$10.88 \pm 1.08^{a,1}$	$16.61 \pm 0.22^{a,2}$
LOTE II	$10.66 \pm 1.19^{b,a,1}$	$9.64 \pm 0.65^{a,1}$	$15.79 \pm 1.33^{a,2}$
LOTE III	$14.13 \pm 1.04^{b,1}$	$12.50 \pm 0.65^{a,1}$	---
ASPARRAGINA			
CONTROL	$0.23 \pm 0.03^{a,1}$	$0.16 \pm 0.02^{a,1}$	$0.35 \pm 0.02^{a,2}$
LOTE II	$0.24 \pm 0.05^{a,1,2}$	$0.12 \pm 0.004^{a,b,1}$	$0.37 \pm 0.07^{a,2}$
LOTE III	$0.32 \pm 0.01^{a,1}$	$0.10 \pm 0.02^{b,2}$	---
GLUTAMICO			
CONTROL	$3.28 \pm 0.11^{a,1}$	$3.36 \pm 0.22^{a,1}$	$2.69 \pm 0.26^{a,1}$
LOTE II	$2.54 \pm 0.08^{b,1}$	$2.82 \pm 0.15^{a,1}$	$2.61 \pm 0.24^{a,1}$
LOTE III	$2.04 \pm 0.03^{c,1}$	$2.11 \pm 0.20^{b,1}$	---
GLUTAMINA			
CONTROL	$0.43 \pm 0.21^{a,1}$	$0.14 \pm 0.02^{a,1}$	$0.37 \pm 0.06^{a,1}$
LOTE II	$0.35 \pm 0.07^{a,1,2}$	$0.12 \pm 0.03^{a,1}$	$0.48 \pm 0.10^{a,2}$
LOTE III	$0.44 \pm 0.03^{a,1}$	$0.37 \pm 0.09^{b,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 36b**AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)****EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
SERINA			
CONTROL	$1.91 \pm 0.12^{a,1}$	$1.53 \pm 0.06^{a,1}$	$1.76 \pm 0.18^{a,1}$
LOTE II	$2.26 \pm 0.15^{b,a,1}$	$5.59 \pm 0.47^{b,2}$	$7.57 \pm 0.61^{b,3}$
LOTE III	$2.51 \pm 0.12^{b,1}$	$1.32 \pm 0.12^{a,2}$	---
GLICINA			
CONTROL	$2.22 \pm 0.29^{a,1}$	$1.64 \pm 0.08^{a,1,2}$	$1.43 \pm 0.15^{a,2}$
LOTE II	$1.68 \pm 0.07^{a,1}$	$2.02 \pm 0.16^{a,1}$	$2.33 \pm 0.37^{a,1}$
LOTE III	$2.33 \pm 0.17^{a,1}$	$1.78 \pm 0.17^{a,1}$	---
TREONINA			
CONTROL	$0.99 \pm 0.11^{a,1}$	$0.55 \pm 0.05^{a,2}$	$1.15 \pm 0.13^{a,1}$
LOTE II	$1.47 \pm 0.15^{b,a,1}$	$1.77 \pm 0.03^{b,1}$	$2.62 \pm 0.24^{b,2}$
LOTE III	$1.72 \pm 0.17^{b,1}$	$0.78 \pm 0.13^{a,2}$	---
ALANINA			
CONTROL	$2.22 \pm 0.08^{a,1}$	$1.69 \pm 0.09^{a,2}$	$2.68 \pm 0.16^{a,3}$
LOTE II	$2.61 \pm 0.09^{a,1}$	$1.23 \pm 0.05^{b,2}$	$2.65 \pm 0.22^{a,1}$
LOTE III	$2.62 \pm 0.16^{a,1}$	$1.82 \pm 0.08^{a,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

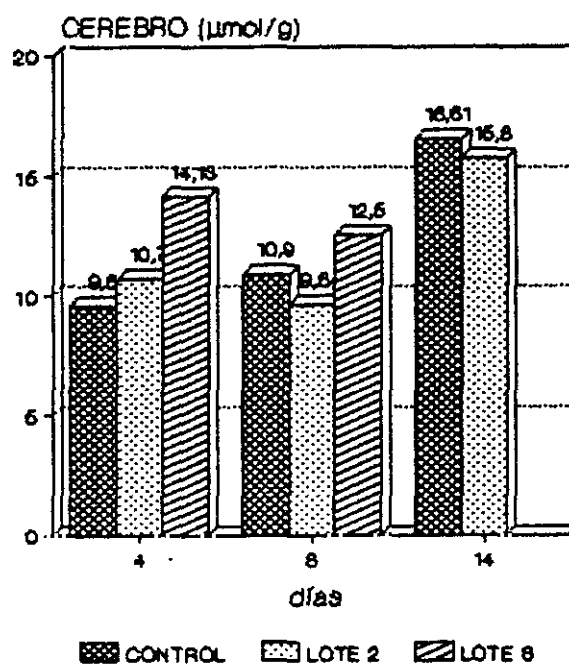
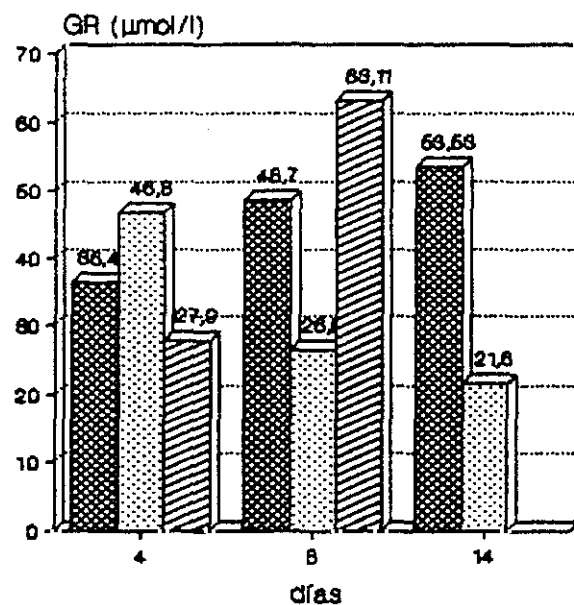
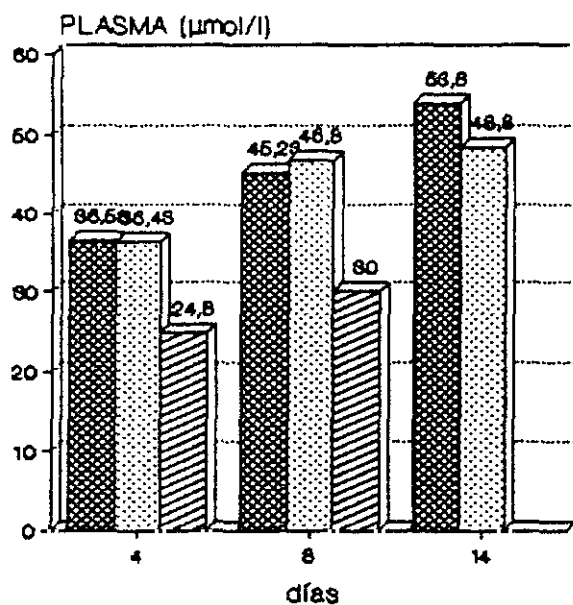
Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

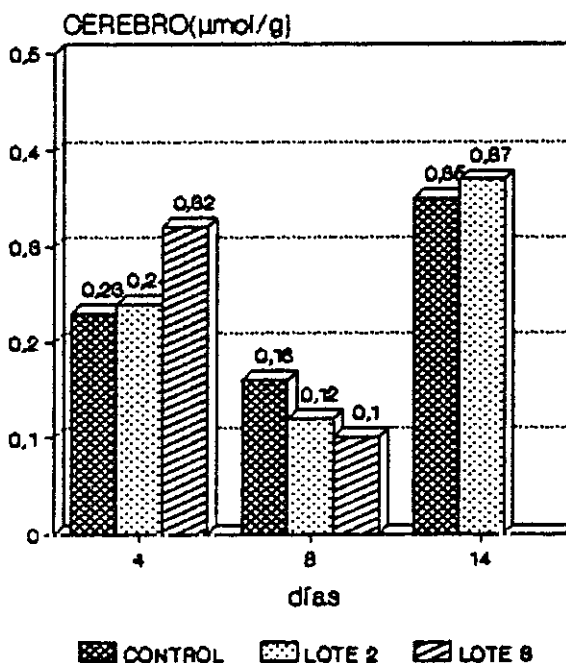
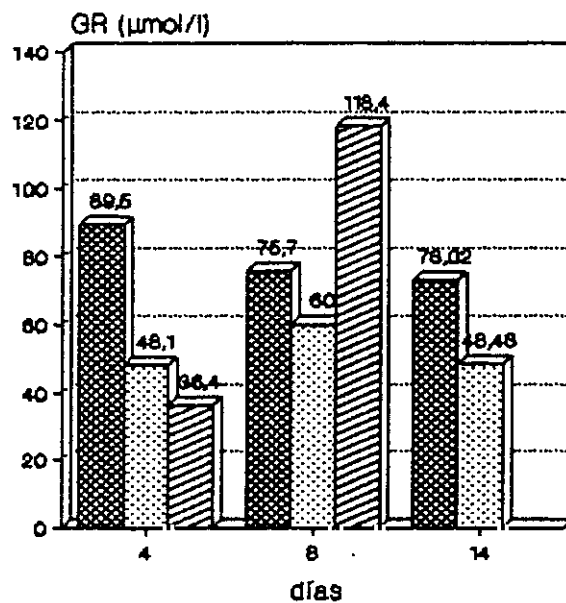
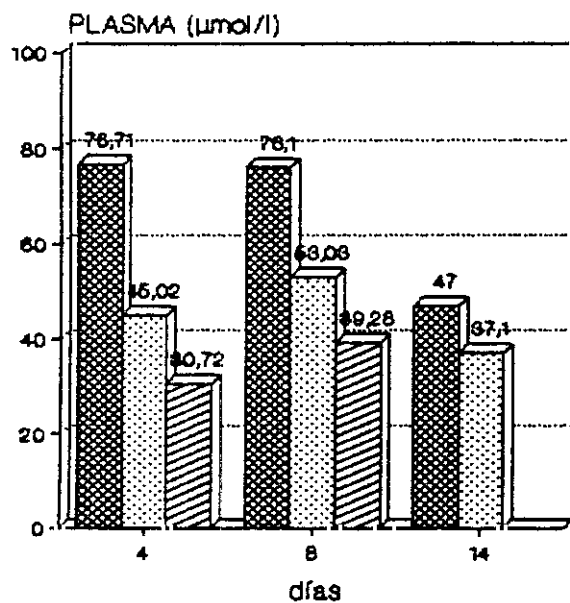
GRAFICA XII.- CONCENTRACIONES DE ACIDO ASPARTICO LIBRE
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

ASPARTICO



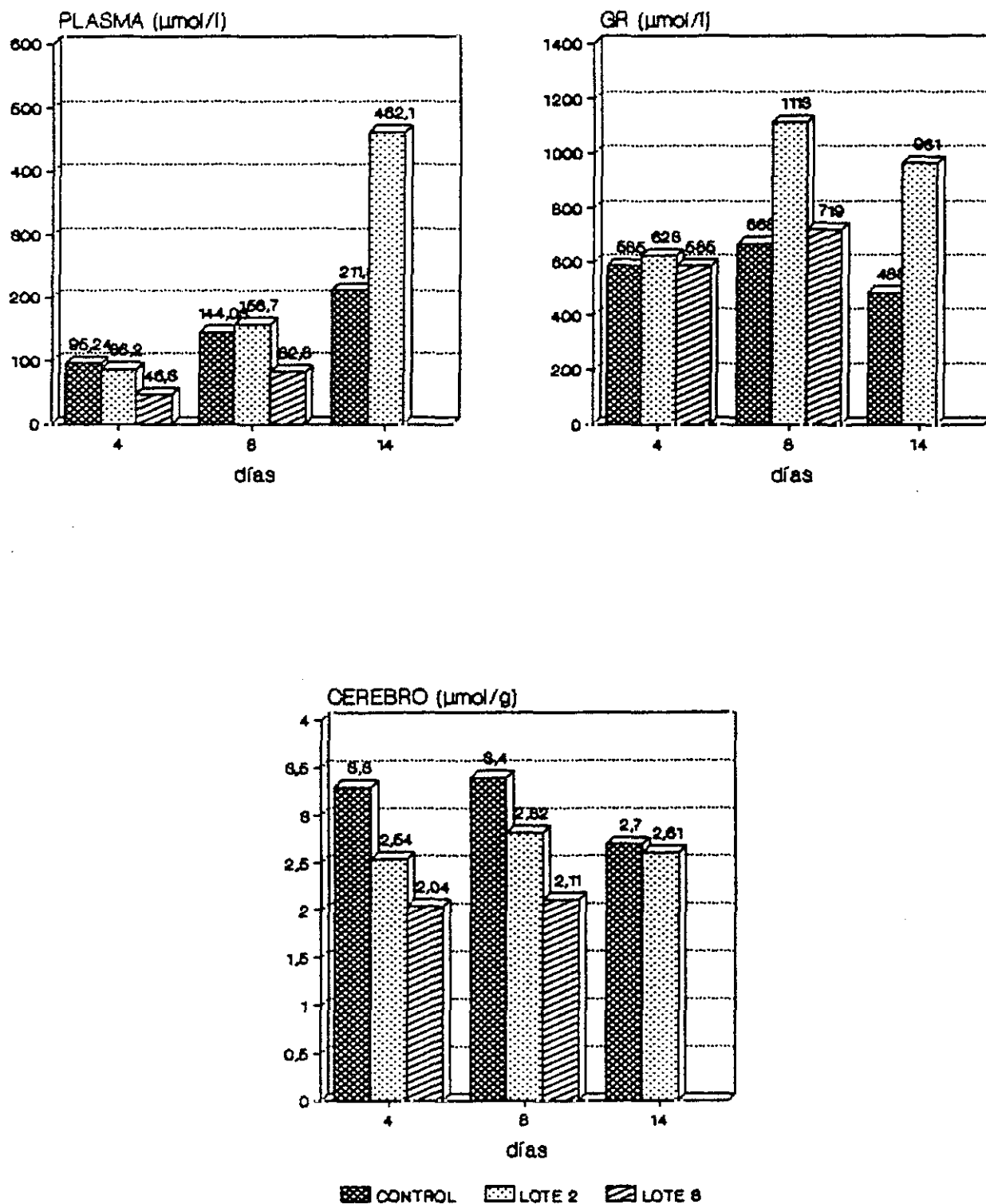
GRAFICA XIII.- CONCENTRACION DE ASPARRAGINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

ASPARRAGINA



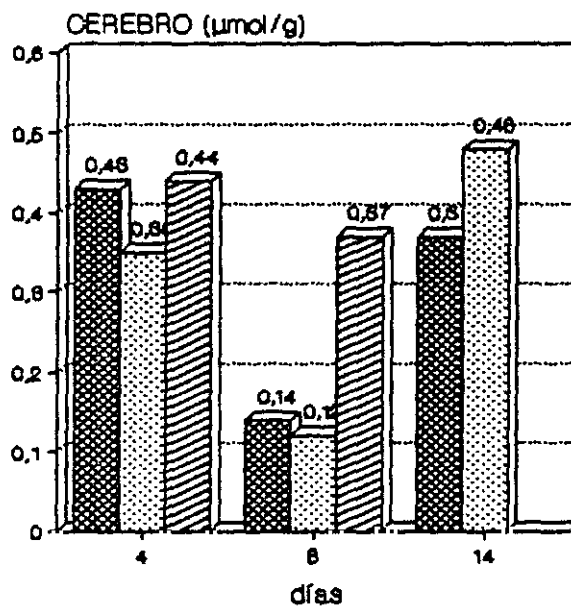
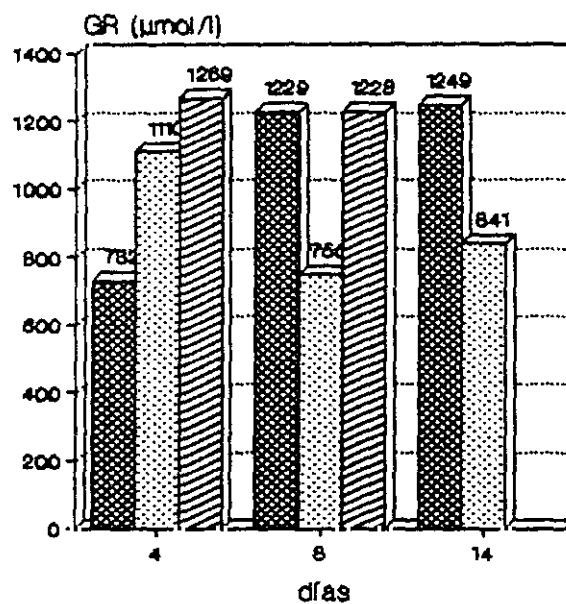
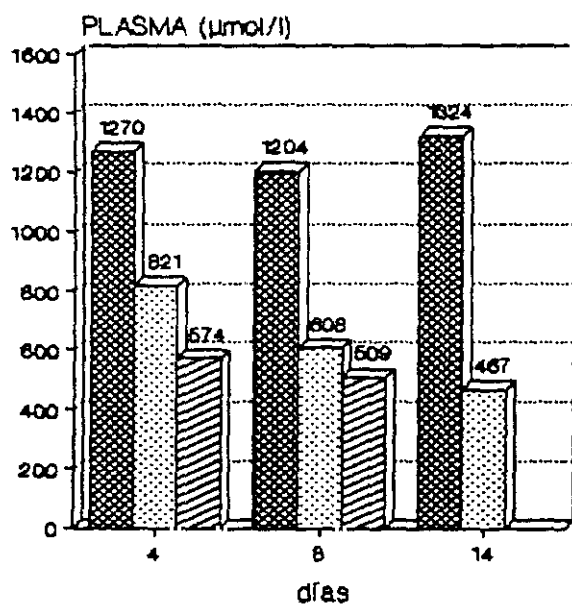
GRAFICA XIV.- CONCENTRACION DE ACIDO GLUTAMICO LIBRE
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

GLUTAMICO



GRAFICA XV.- CONCENTRACION DE GLUTAMINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

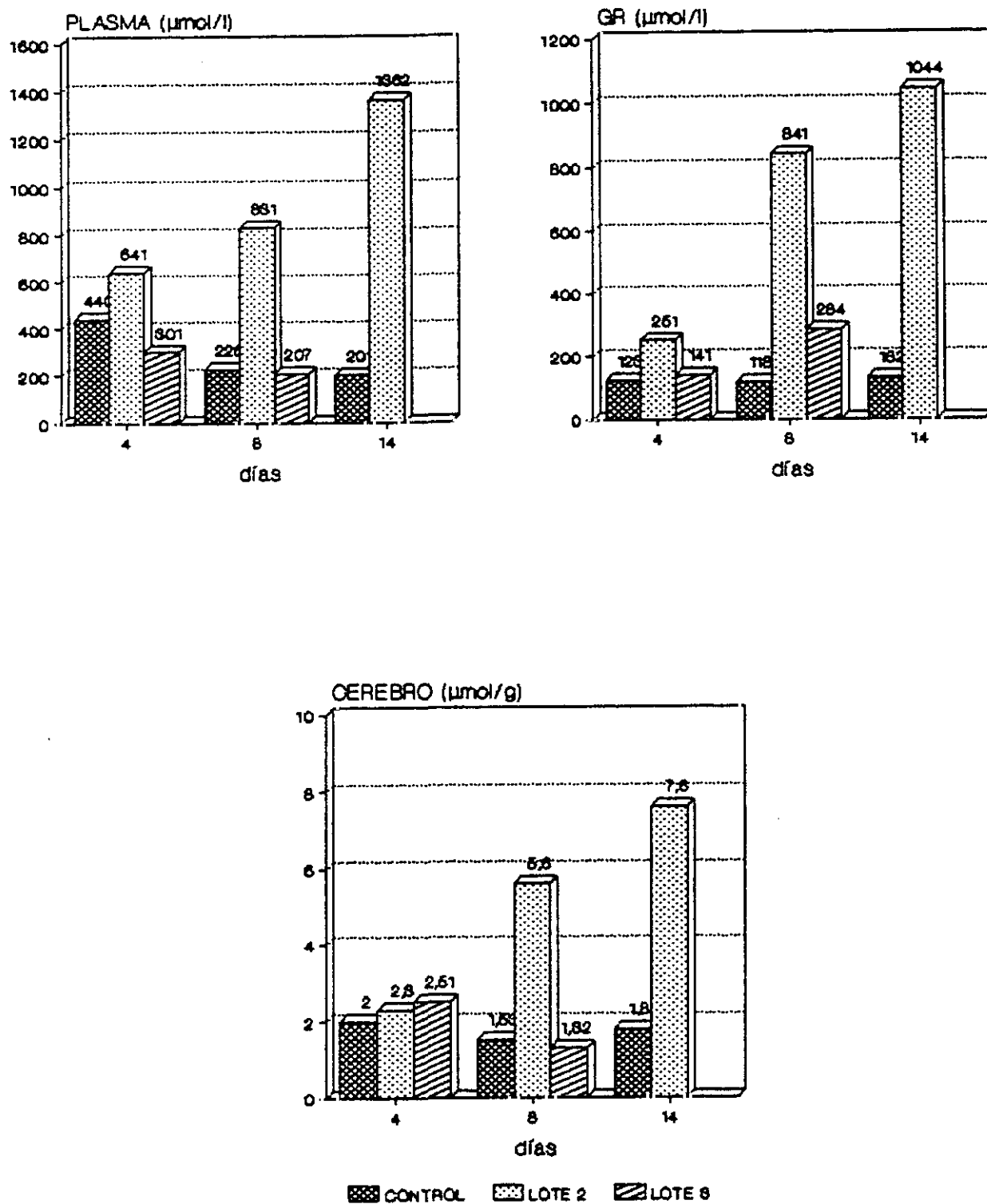
GLUTAMINA



■ CONTROL ■ LOTE 2 ▨ LOTE 8

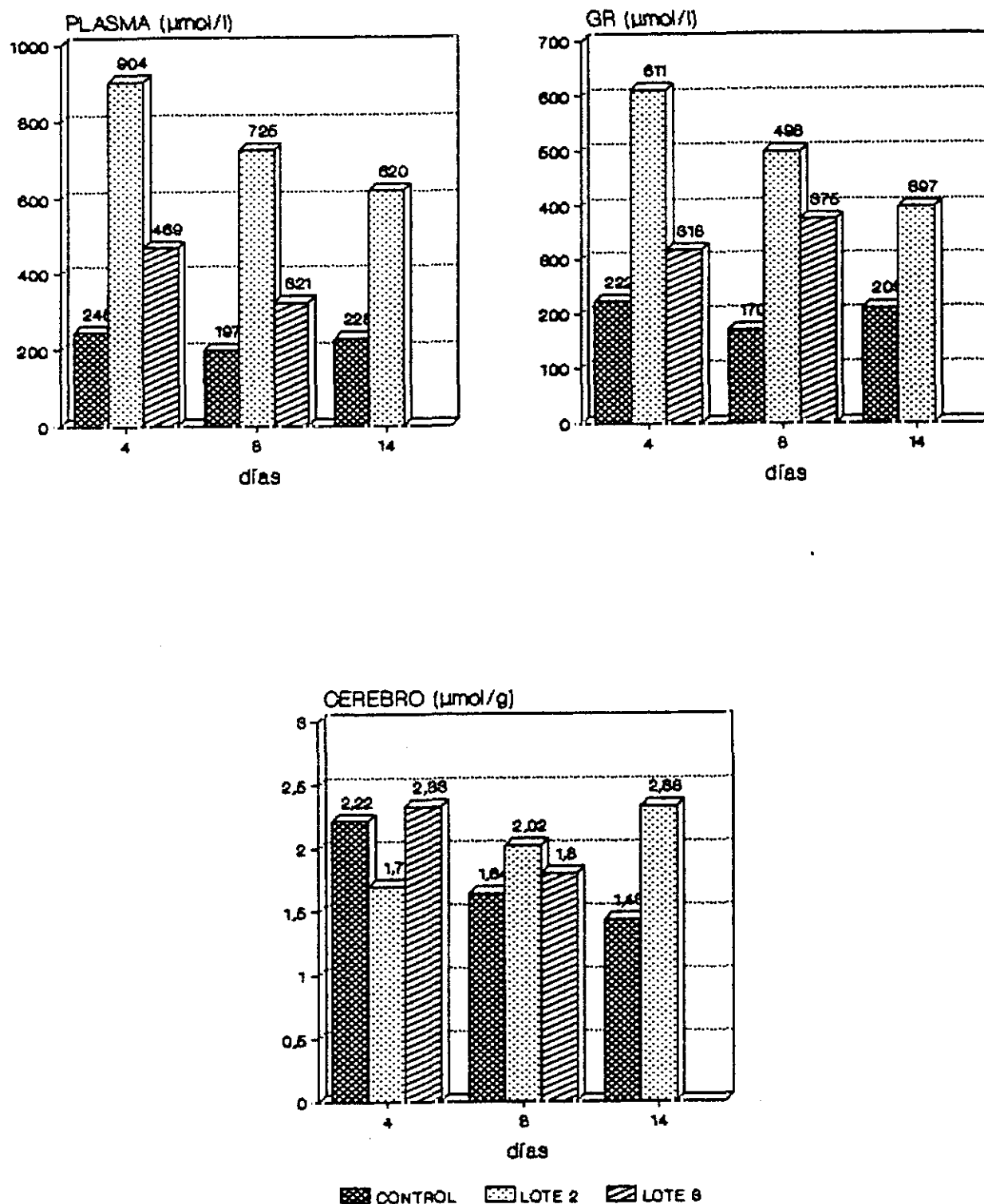
GRAFICA XVI.- CONCENTRACION DE SERINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

SERINA



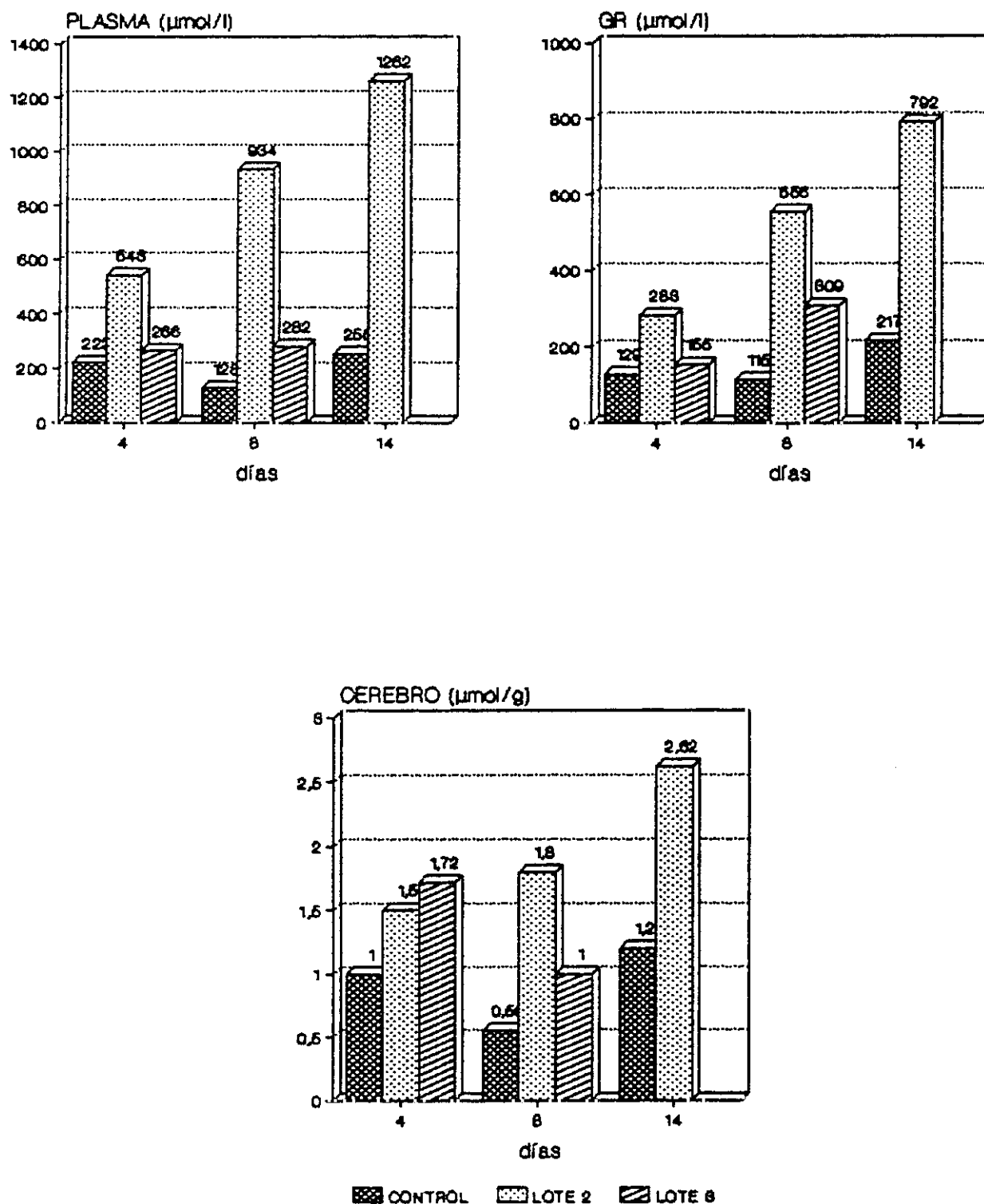
GRAFICA XVII.- CONCENTRACION DE GLICINA LIBRE EN
PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

GLICINA



GRAFICA XVIII.- CONCENTRACION DE TREONINA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

TREONINA



GRAFICA XIX.- CONCENTRACION DE ALANINA EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

ALANINA

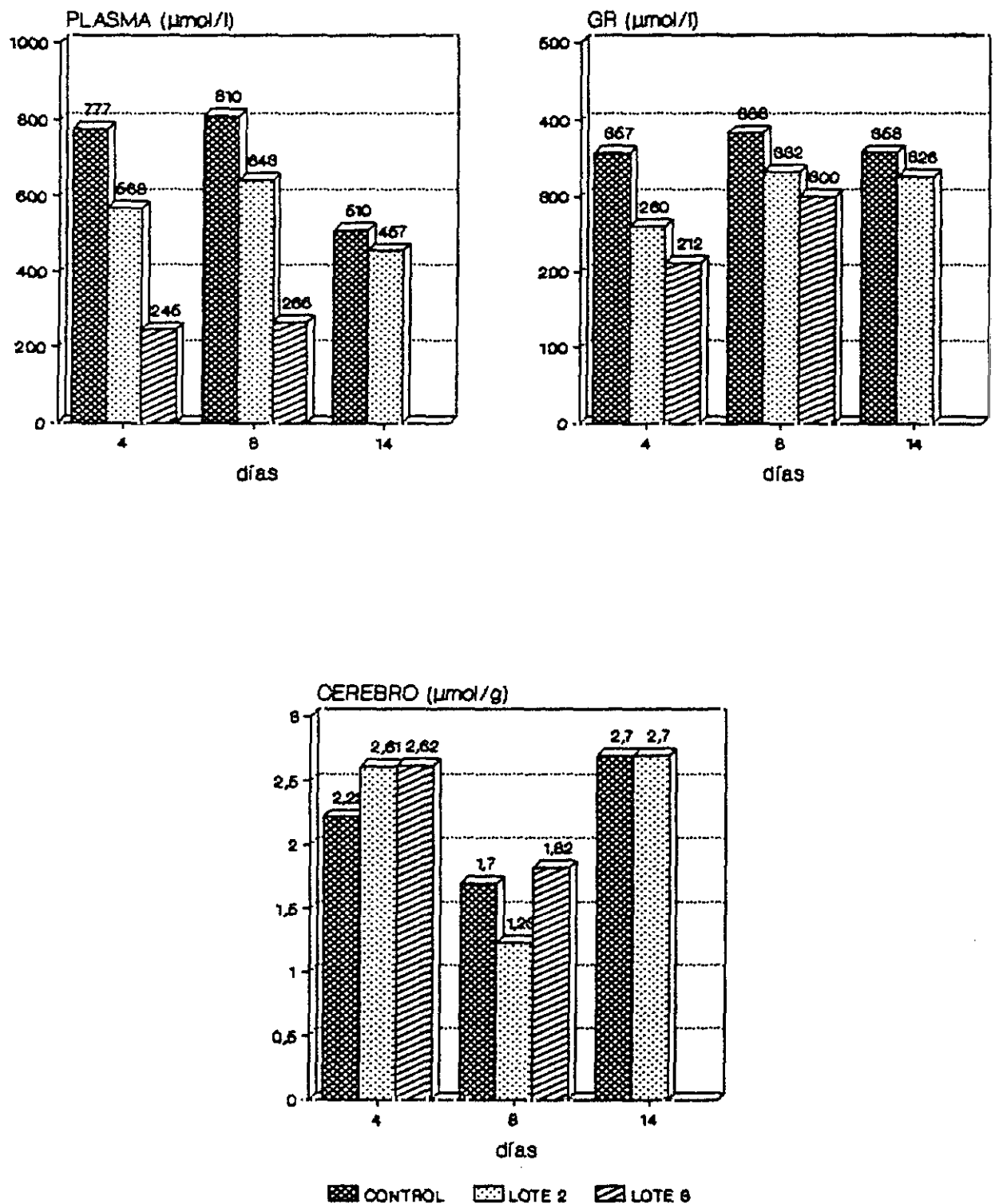


TABLA 37

AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES (1) ($\mu\text{mol/g}$ tejido)

EN CEREBRO

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
TIROSINA			
CONTROL	$0.32 \pm 0.05^{a,1}$	$0.30 \pm 0.02^{a,1}$	$0.40 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 11	$0.17 \pm 0.04^{b,1}$	$0.11 \pm 0.01^{b,1}$	$0.44 \pm 0.03^{a,2}$
LOTE 111	$0.21 \pm 0.01^{a,b,1}$	$0.20 \pm 0.02^{c,1}$	---
FENILALANINA			
CONTROL	$0.21 \pm 0.04^{a,1,2}$	$0.11 \pm 0.004^{a,1}$	$0.31 \pm 0.04^{a,2}$
LOTE 11	$0.33 \pm 0.004^{b,1}$	$0.10 \pm 0.01^{a,2}$	$0.32 \pm 0.04^{a,1}$
LOTE 111	$0.44 \pm 0.04^{c,1}$	$0.14 \pm 0.02^{a,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye el triptófano.

TABLA 38

**SUMA DE AMINOACIDOS AROMATICOS, SUMA DE AMINOACIDOS
NEUTROS Y RELACION ENTRE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y
AMINOACIDOS AROMATICOS ($\mu\text{mol/g}$ tejido) EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
AAA (1)			
CONTROL	$0.53 \pm 0.09^{a,1,2}$	$0.41 \pm 0.02^{a,1}$	$0.71 \pm 0.05^{a,2}$
LOTE 11	$0.49 \pm 0.04^{a,1}$	$0.21 \pm 0.02^{b,2}$	$0.76 \pm 0.04^{a,3}$
LOTE 111	$0.64 \pm 0.04^{a,1}$	$0.34 \pm 0.02^{a,2}$	---
AAN (2)			
CONTROL	$1.74 \pm 0.34^{a,1,2}$	$0.96 \pm 0.04^{a,1}$	$2.31 \pm 0.26^{a,2}$
LOTE 11	$2.55 \pm 0.08^{a,b,1}$	$0.88 \pm 0.02^{a,2}$	$2.57 \pm 0.37^{a,1}$
LOTE 111	$2.95 \pm 0.27^{b,1}$	$1.11 \pm 0.12^{a,2}$	---
AAR/AAA			
CONTROL	$2.22 \pm 0.20^{a,1}$	$1.38 \pm 0.10^{a,2}$	$2.23 \pm 0.16^{a,1}$
LOTE 11	$4.32 \pm 0.47^{b,1}$	$3.26 \pm 0.31^{b,1,2}$	$2.34 \pm 0.32^{a,2}$
LOTE 111	$3.55 \pm 0.13^{b,1}$	$2.30 \pm 0.23^{c,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

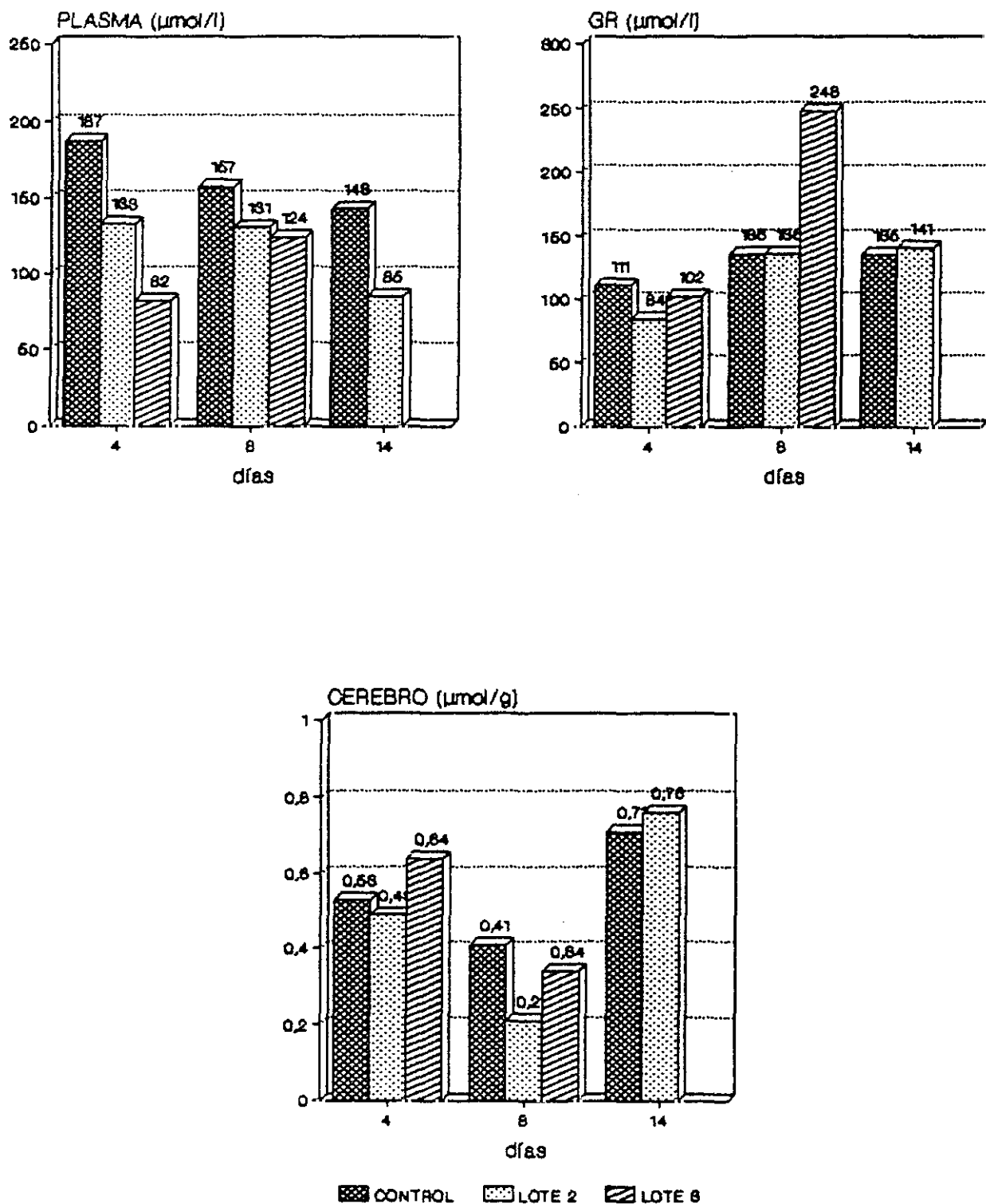
--- Efecto letal de la dieta.

(1) AAA = Tirosina + Fenilalanina

(2) AAN = AAR + AAA

GRAFICA XX.- SUMA DE AMINOACIDOS AROMATICOS EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

AAA



GRAFICA XXI.- SUMA DE AMINOACIDOS NEUTROS EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

AAN

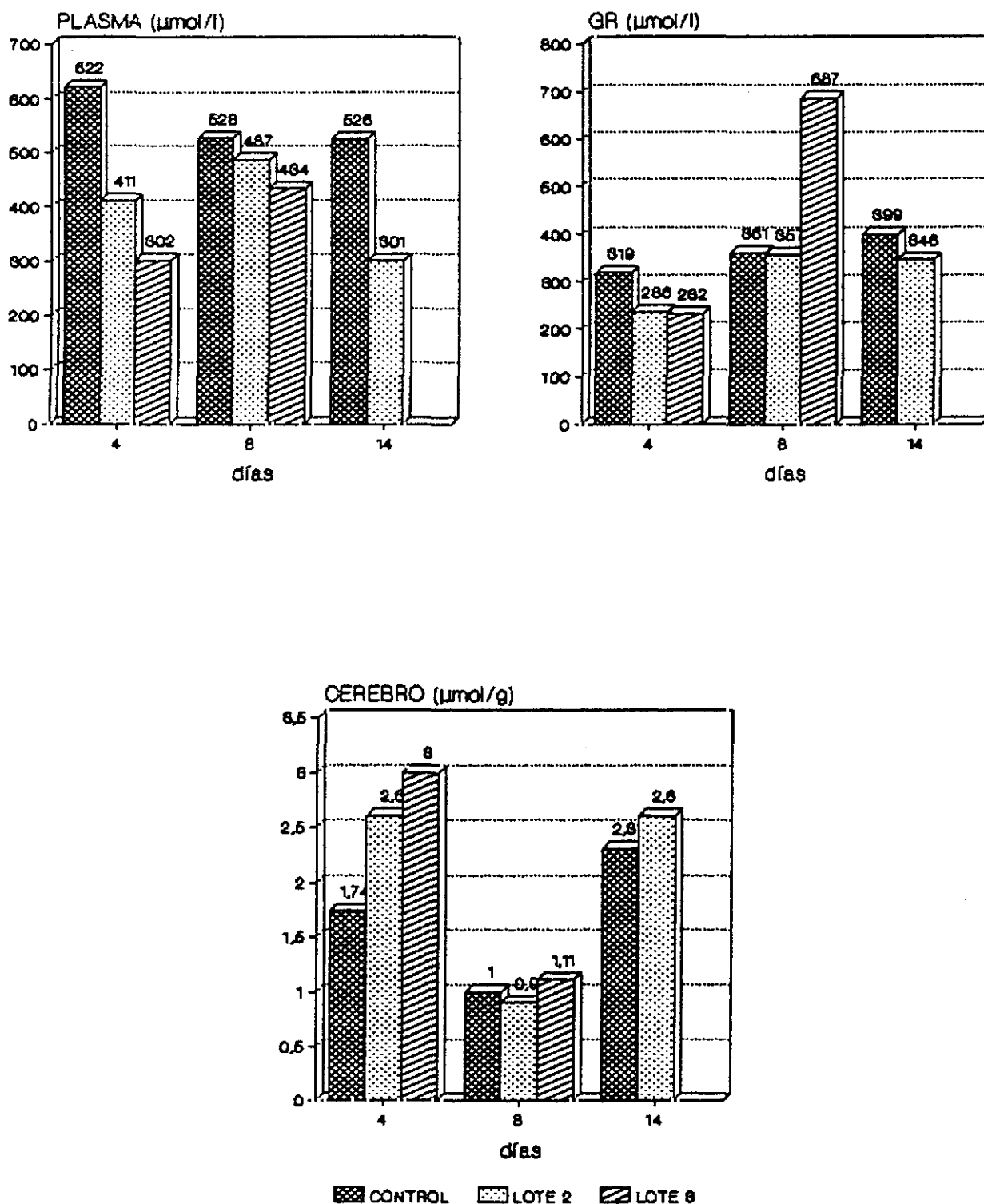


TABLA 39**AMINOACIDOS BASICOS (1) LIBRES Y AMINOACIDOS AZUFRADOS ($\mu\text{mol/g}$ tejido)****EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ARGININA			
CONTROL	$0.38 \pm 0.12^{a,1,2}$	$0.18 \pm 0.02^{a,1}$	$0.59 \pm 0.06^{a,2}$
LOTE 11	$0.41 \pm 0.13^{a,1,2}$	$0.20 \pm 0.03^{a,1}$	$0.74 \pm 0.08^{a,2}$
LOTE 111	$0.86 \pm 0.08^{b,1}$	$0.29 \pm 0.04^{a,2}$	---
HISTIDINA			
CONTROL	$0.04 \pm 0.02^{a,1}$	$0.01 \pm 0.001^{a,1}$	$0.04 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 11	$0.03 \pm 0.01^{a,1,2}$	$0.01 \pm 0.003^{a,1}$	$0.05 \pm 0.01^{a,2}$
LOTE 111	$0.04 \pm 0.002^{a,1}$	$0.04 \pm 0.01^{b,1}$	---
TAURINA			
CONTROL	$7.68 \pm 0.55^{a,1}$	$8.05 \pm 0.64^{a,1}$	$8.90 \pm 0.53^{a,1}$
LOTE 11	$6.61 \pm 0.44^{a,1}$	$6.37 \pm 0.33^{a,b,1}$	$5.40 \pm 0.57^{b,1}$
LOTE 111	$7.18 \pm 0.36^{a,1}$	$6.16 \pm 0.38^{b,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye la lisina.

GRAFICA XXII.- CONCENTRACION DE ARGININA LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

ARGININA

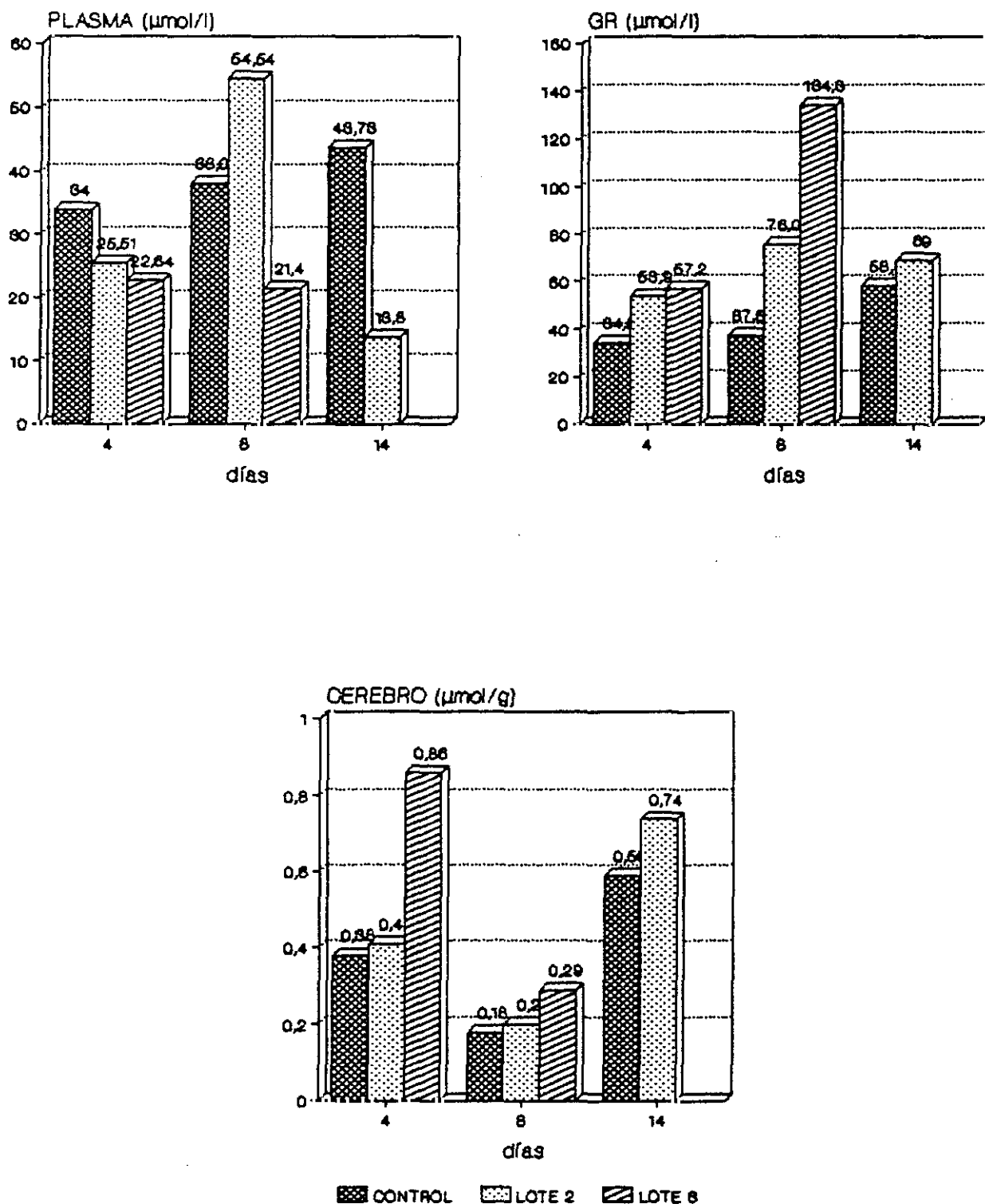


TABLA 40

**SUMA DE AMINOACIDOS ESENCIALES, SUMA DE AMINOACIDOS
NO ESENCIALES, RELACION ENTRE AMBOS Y SUMA DE AMINOACIDOS
TOTALES LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido) EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
AAE (1)			
CONTROL	$2.84 \pm 0.48^{a,1}$	$1.40 \pm 0.04^{a,2}$	$3.69 \pm 0.44^{a,1}$
LOTE 11	$4.30 \pm 0.27^{b,a,1}$	$2.75 \pm 0.06^{b,2}$	$5.53 \pm 0.65^{a,1}$
LOTE 111	$5.36 \pm 0.46^{b,1}$	$2.02 \pm 0.28^{c,2}$	---
AANE (2)			
CONTROL	$19.92 \pm 1.72^{a,1}$	$19.52 \pm 1.46^{a,1}$	$25.93 \pm 0.66^{a,2}$
LOTE 11	$20.26 \pm 1.16^{a,1}$	$21.51 \pm 0.99^{a,1}$	$31.88 \pm 1.93^{b,2}$
LOTE 111	$24.29 \pm 1.46^{a,1}$	$20.09 \pm 0.72^{a,1}$	---
AAE/AANE			
CONTROL	$0.14 \pm 0.02^{a,1}$	$0.07 \pm 0.004^{a,2}$	$0.14 \pm 0.01^{a,1}$
LOTE 11	$0.21 \pm 0.01^{b,1}$	$0.13 \pm 0.01^{b,2}$	$0.18 \pm 0.02^{a,1,2}$
LOTE 111	$0.22 \pm 0.01^{b,1}$	$0.10 \pm 0.01^{a,b,2}$	---
AAT (3)			
CONTROL	$22.76 \pm 2.03^{a,1}$	$20.92 \pm 1.48^{a,1}$	$29.62 \pm 1.06^{a,2}$
LOTE 11	$24.56 \pm 1.33^{b,a,1}$	$24.26 \pm 1.00^{a,1}$	$37.41 \pm 2.01^{b,2}$
LOTE 111	$29.65 \pm 1.87^{b,1}$	$22.11 \pm 0.85^{a,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

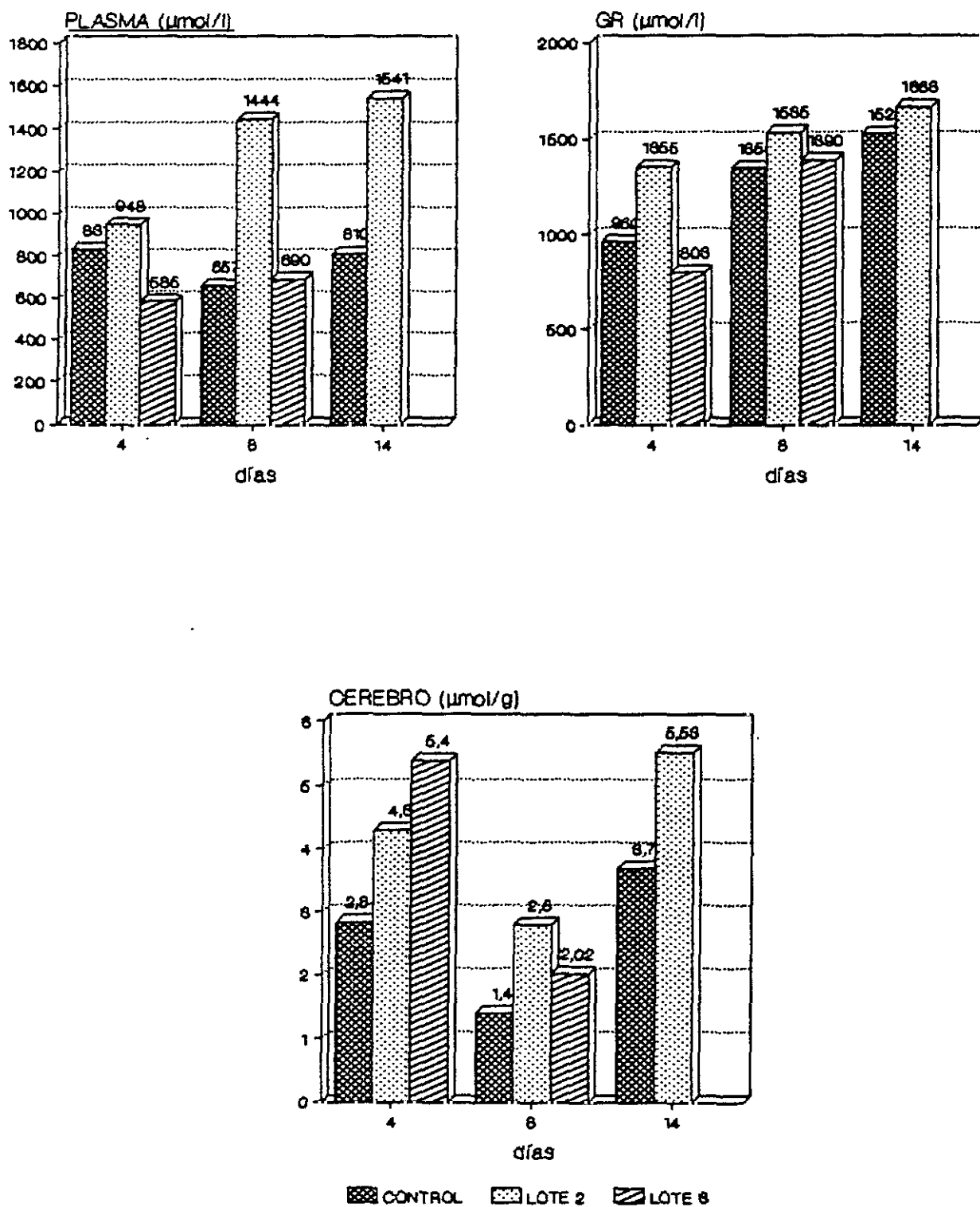
(1) AAE = Arg + His + Ile + Leu + Phe + Thr + Val

(2) AANE = Ala + Asp + Glu + Gln + Gly + Ser + Tyr

(3) AAT = AAE + AANE

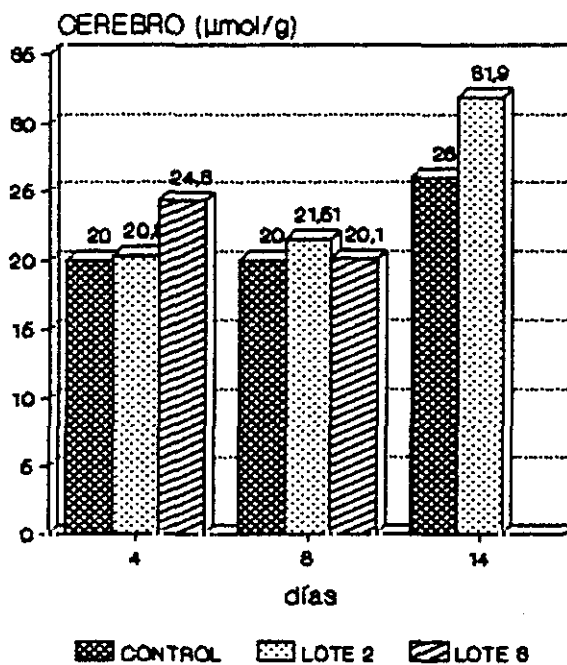
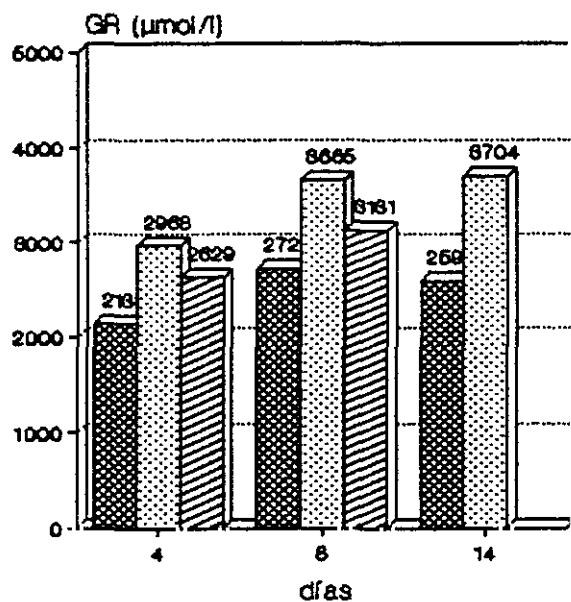
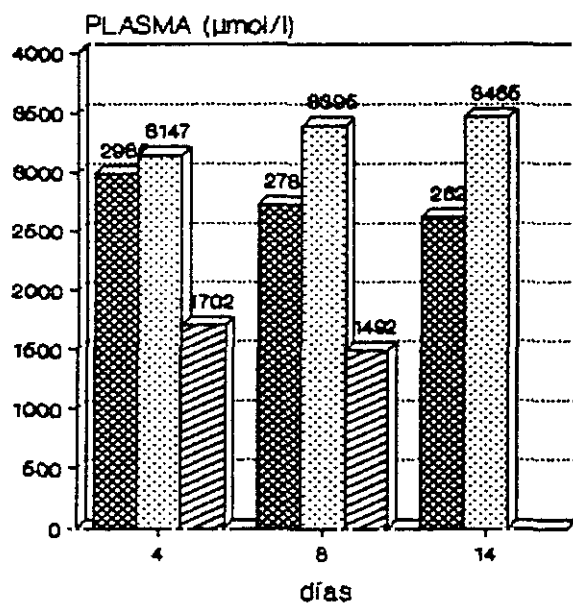
GRAFICA XXIII.- SUMA DE AMINOACIDOS ESENCIALES EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREbro

AAE



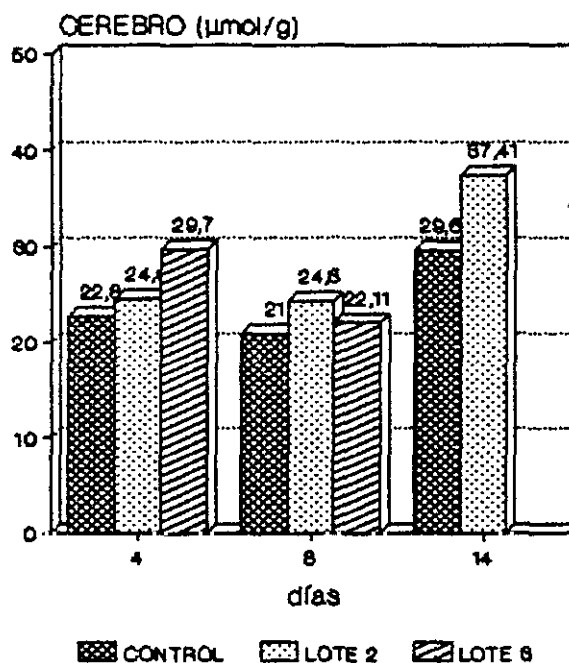
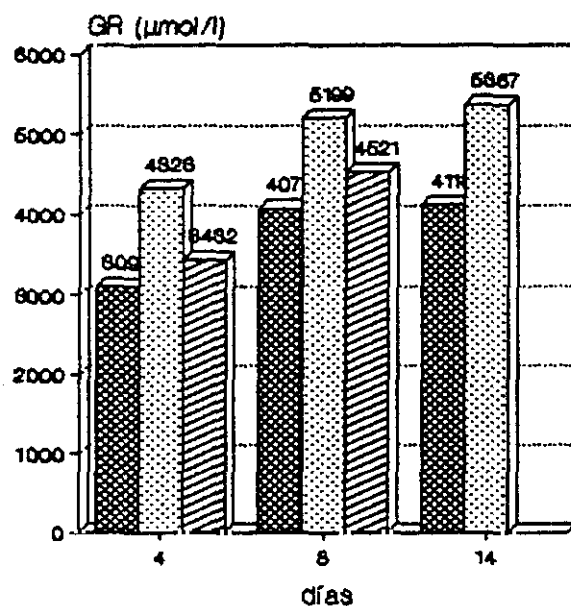
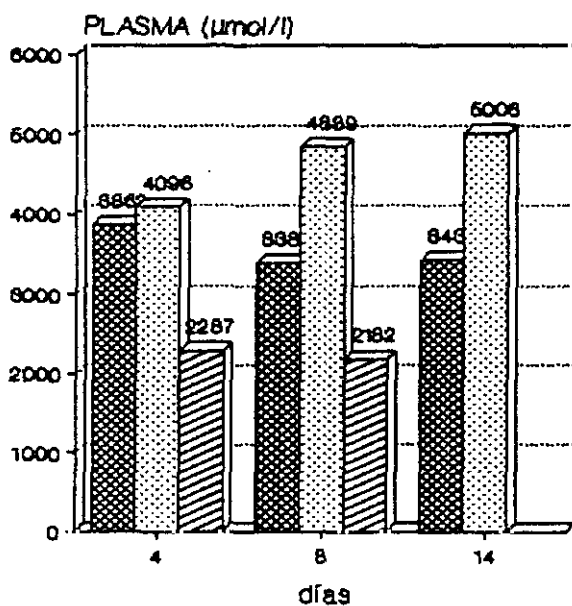
GRAFICA XXIV.- SUMA DE AMINOACIDOS NO ESENCIALES EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

AANE



GRAFICA XXV.- SUMA TOTAL DE AMINOACIDOS EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

AAT



GRAFICA XXVI.- RELACION AMINOACIDOS ESENCIALES/NO ESENCIALES
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

AAE/AANE

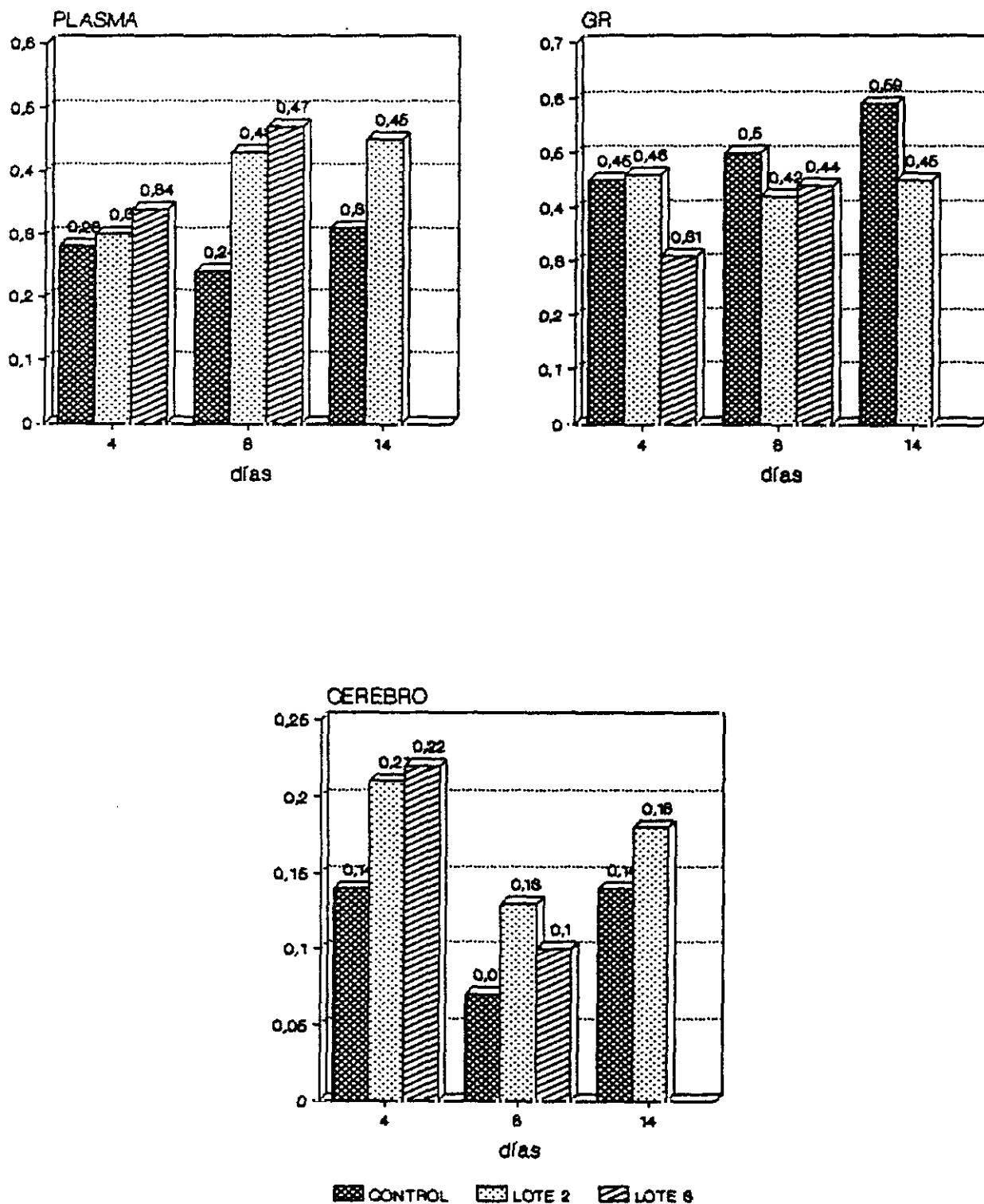


TABLA 41**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)****EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
ALANINA/TIROSINA			
CONTROL	$7.94 \pm 1.35^{a,1}$	$5.91 \pm 0.65^{a,1}$	$6.70 \pm 0.30^{a,1}$
LOTE II	$21.45 \pm 6.69^{b,1}$	$11.63 \pm 1.64^{b,1}$	$6.15 \pm 0.55^{a,1}$
LOTE III	$12.90 \pm 0.72^{a,1}$	$9.83 \pm 1.29^{a,b,1}$	---
ALANINA/LEUCINA			
CONTROL	$5.28 \pm 1.66^{a,1}$	$7.26 \pm 0.65^{a,1}$	$4.56 \pm 0.61^{a,1}$
LOTE II	$3.17 \pm 0.03^{a,1}$	$5.66 \pm 0.36^{a,2}$	$3.86 \pm 0.42^{a,1}$
LOTE III	$2.60 \pm 0.10^{a,1}$	$6.68 \pm 0.65^{a,2}$	---
ALANINA/AAR			
CONTROL	$2.31 \pm 0.62^{a,1}$	$3.10 \pm 0.28^{a,1}$	$1.74 \pm 0.15^{a,1}$
LOTE II	$1.27 \pm 0.03^{a,1}$	$1.83 \pm 0.04^{b,2}$	$1.56 \pm 0.15^{a,1,2}$
LOTE III	$1.16 \pm 0.05^{a,1}$	$2.46 \pm 0.21^{a,b,2}$	---
FENILALANINA/TIROSINA			
CONTROL	$0.68 \pm 0.06^{a,1}$	$0.39 \pm 0.05^{a,2}$	$0.77 \pm 0.10^{a,1}$
LOTE II	$2.68 \pm 0.84^{b,1}$	$0.93 \pm 0.16^{b,1,2}$	$0.76 \pm 0.10^{a,2}$
LOTE III	$2.16 \pm 0.15^{a,b,1}$	$0.77 \pm 0.15^{a,b,2}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 42

**RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN CEREBRO**

	<u>DIA 4</u>	<u>DIA 8</u>	<u>DIA 14</u>
SER+GLI+ALA/AAR			
CONTROL	$6.46 \pm 1.47^{a,1,2}$	$8.92 \pm 0.78^{a,1}$	$3.78 \pm 0.24^{a,2}$
LOTE II	$3.20 \pm 0.14^{a,1}$	$13.21 \pm 0.71^{b,2}$	$7.53 \pm 1.04^{b,3}$
LOTE III	$3.31 \pm 0.19^{a,1}$	$6.68 \pm 0.72^{a,2}$	---
GLICINA/VALINA			
CONTROL	$3.31 \pm 0.65^{a,1}$	$3.13 \pm 0.53^{a,1}$	$2.03 \pm 0.07^{a,1}$
LOTE II	$2.13 \pm 0.18^{a,1}$	$6.54 \pm 0.36^{b,2}$	$4.43 \pm 0.47^{b,3}$
LOTE III	$2.23 \pm 0.12^{a,1}$	$2.67 \pm 0.23^{a,1}$	---

Valores medios de cuatro animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.

Números diferentes en filas indican variaciones significativas
($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

5.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS

5.1.- MODELO DE ANIMALES APLICADOS A LA INVESTIGACION DE MALNUTRICION CEREBRAL

Numerosos autores (LEVINE y WEINER, 1975; CRNIC, 1976; SMART, 1984; FLEISHER y TURKEWITZ, 1984; BEYNEN y WEST, 1986) han realizado estudios acerca del uso de animales para la investigación de los efectos de la malnutrición en el cerebro.

La rata es el animal más idóneo para este tipo de experimentos, otros animales como el ratón y los primates también se han usado pero en menor cuantía. Ello se ve apoyado por razones fisiológicas y económicas, aunque el investigador siempre habrá de considerar la influencia medioambiental sobre la malnutrición. Esta situación no es reproducible cuando se trabaja en condiciones controladas con animales de laboratorio. Es por lo que la extrapolación de datos del animal al hombre habrá de ser cuidadosa (GALLER y KANIS, 1987).

Los métodos empleados para inducir malnutrición en animales son múltiples. Los efectos dependen del tipo de deficiencia nutricional y del periodo en el que esta se lleve a cabo. En la rata , el periodo crítico corresponde al de gestación y a las tres semanas después de su nacimiento, ya que en esta época se produce un crecimiento y desarrollo rápido del cerebro. Además, la duración y el grado de deficiencia nutricional también son factores determinantes (DOBBING, 1971).

En este experimento se han utilizado ratas macho en periodo de crecimiento. El destete se practica a los 21 días, momento en el que tienen un peso aproximado de 38 gramos. Después del destete, se alimentan con una dieta stock de laboratorio hasta alcanzar un peso de 87 ± 6.9 gramos. Seguidamente pasan un periodo de adaptación de tres días con dieta control y agua "ad libitum". Pasado este tiempo, comienza el experimento y las ratas divididas en lotes reciben durante 20 días las dietas de composición diferente ya descritas.

Por lo tanto, aunque se trata de animales que han pasado el periodo crítico (tres semanas después del nacimiento) de crecimiento y desarrollo cerebral, no llegan a ser adultas, estando aún en periodo de crecimiento.

5.2.- EFECTO DE LA CARENCIA DE MET + CIS Y MET + CIS Y ENERGIA SOBRE LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL (TABLA1)

5.2.1.- Ingesta

Los animales, en general, son sensibles a los componentes proteicos y energéticos de la dieta, jugando los aminoácidos un importante papel en la regulación de la ingesta alimentaria, que es el principal factor que controla el metabolismo cerebral, especialmente a nivel de neurotransmisores.

Si a un grupo de ratas en estudio se les permite controlar su ingesta proteica y calórica, seleccionarán una cantidad de proteínas suficiente para conseguir sus requerimientos adecuados en aminoácidos y así mantener su crecimiento y reproducción normales (OSBORNE y MENDEL, 1918; MUSTEN y col., 1974; OVERMAN, 1976; LEUNG y col., 1981; REEVES y O'DELL, 1981; PETERS y col., 1983; PETERS y HARPER, 1987; TACKMAN y col., 1990).

Una gran variedad de estudios de autoselección utilizando ratas, han puesto en evidencia, que la ingesta proteica es controlada independientemente de la ingesta energética (ANDERSON, 1979). A diferencia de la ingesta energética, la ingesta proteica se mantiene entre ciertos límites, aunque no es controlada con precisión (LEUNG y col., 1981; PETERS y HARPER, 1981; LEATHWOOD y

ASHLEY, 1983a; PETERS y HARPER, 1985). El límite inferior corresponde a un nivel de proteínas que mantendrán el crecimiento y el límite superior parece estar *relacionado con aquel nivel de proteínas que excede la capacidad del animal para degradar los aminoácidos que no pueden ser utilizados para la síntesis proteica.*

Las ratas disminuyen su ingesta alimentaria (o la evitan si pueden elegir) con dietas altas en proteínas, deficientes en algún aminoácido, con un contenido desproporcionado de aminoácidos o con aquellas dietas bajas en proteínas y carentes de un aminoácido esencial. Los mecanismos que identifican un exceso o deficiencia de ingesta proteica y la selección de dietas con diferente contenido de proteínas son objeto de duda y controversia (LEUNG y col., 1981; PETERS y HARPER, 1981; LEATWOOD y ASHLEY, 1983a; PETERS y HARPER, 1985; TACKMAN y col., 1990).

MEYER y HARGUS (1959) ya indican que animales alimentados con una dieta baja en proteínas comían poco porque ingerían un exceso de energía en relación a la proteína. Más tarde BOOTH y col. (1970) en humanos observan que la proteína es más efectiva que una cantidad isocalórica de carbohidratos o grasa en el mantenimiento de la saciedad durante algunas horas después de haber comido.

Son muchos los investigadores que han hecho hincapié en la necesidad de mantener un patrón de aminoácidos plasmáticos (KUMTA y HARPER, 1962; SANAHA y HARPER, 1963; ANDERSON y col., 1968; LEUNG y col., 1968; PETERS y HARPER, 1987; TACKMAN y col., 1990) y cerebrales (SAUBERLICH, 1961; ROBERTS, 1965; Mc KEAN y col., 1968; DANIEL y WAISMAN, 1969; AGRAWAL y col., 1970; PENG y col., 1972; PETERS y HARPER, 1987; TACKMAN y col., 1990) equilibrado para que la ingesta nutricional sea normal. Así, dietas deficientes en aminoácidos hacen que se altere la proporción de aminoácidos en plasma (LONGENECKER y HAUSE, 1959; CLARK y col., 1966) lo que induce cambios en la concentración de aminoácidos en cerebro (PENG y col., 1972; ROGERS y LEUNG, 1973; HARPER y PETERS, 1989), situación esta que conduce a una disminución de la ingesta de alimentos (FRAZER y col., 1947; SAUBERLICH, 1961; TACKMAN y col., 1990).

Estas observaciones generales se confirman en nuestro experimento

(GRAFICA 1) en el que al administrar una dieta que carece de los aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, a los animales del lote II, se observa una reducción de la ingesta en un 50%, respecto a controles, hasta el día 8 de la experiencia y llega a ser de un 35% el día 14. Este descenso es provocado de forma más drástica en el lote III (74%), que es alimentado a la par con la mitad de lo ingerido por el lote II, lo que conlleva un menor aporte energético, aunque no proteico. En estos animales, la supervivencia después del día 8 es escasa o nula.

En este sentido, estudios en humanos de VELLAS y col. (1990), relacionan la muerte con la malnutrición.

También se observa una alteración de las concentraciones de aminoácidos sanguíneos y cerebrales, datos que se estudiarán más adelante.

La dificultad se plantea a la hora de decidir cuales son los mecanismos reguladores de la ingesta. BENEVENGA y HARPER (1970) de sus observaciones en ratas, sugieren que dietas altas en proteínas o en metionina retardan el vaciado estomacal, mientras que dietas desequilibradas en un sólo aminoácido producen un efecto muy pequeño sobre el vaciado gástrico.

Además, se sabe que la distensión gástrica deprime la ingesta (SHARMA y col., 1961) probablemente debido a que se activa el centro de saciedad del hipotálamo. Pero SCHARRER y col. (1970) observan que ratas con una lesión hipotalámica disminuyen la ingesta cuando son alimentadas con dietas altas en proteína.

Esto hace pensar que el efecto de las dietas con alta concentración de aminoácidos sobre la ingesta está mediado por otros mecanismos (PENG y col., 1972). En este sentido, MERCER y col. (1989) observan una estrecha relación entre la concentración de histidina cerebral y la ingesta voluntaria. Como la histidina es precursor de la histamina, cuando la histidina cerebral llega a ser elevada, aumenta la síntesis de histamina en el hipotálamo, donde es captada por sus receptores, provocando la liberación de ACTH y corticosterona. Ambas sustancias están elevadas en el plasma durante la malnutrición proteico-energética. Ello conduce hacia un estado de anorexia.

Así, la disminución de la ingesta en ratas alimentadas con dietas desequilibradas en aminoácidos no puede explicarse en base a una palatabilidad escasa, ni a un retardo en el vaciado estomacal (HARPER y col., 1964). Aunque se piensa que son factores que pueden tener su importancia en una primera fase, más tarde son efectos metabólicos los que mandan (LEUNG y col., 1986). De este modo, muchos autores apoyan la idea de que los metabolitos de los aminoácidos, principalmente serotonina, tirosina e histidina, pueden ser una señal para controlar la ingesta proteica (ASHLEY y ANDERSON, 1975; LI y ANDERSON, 1984; MERCER y col., 1989; TACKMAN y col., 1990) o de carbohidratos (THEALL y col., 1984).

PETERS y HARPER (1981, 1985) y otros autores plantean una fuerte relación entre la ingesta proteica y las concentraciones de aminoácidos de cadena ramificada (AAR) en plasma y cerebro y sugieren que cambios en la concentración de los AAR en plasma o cerebro pueden ser indicadores que regulan la ingesta proteica. Los receptores de glucosa, sensibles a las variaciones de la concentración de aminoácidos en sangre y cerebro, puede que también estén involucrados en la regulación de la ingesta (LEUNG y ROGERS, 1971).

Se produce competencia entre los AANL (AAA, AAR, metionina, treonina e histidina) plasmáticos, para su entrada al cerebro a través de la BHE (OLDENDORF y SZABO, 1976; TACKMAN y col., 1990). De manera que la concentración cerebral de un determinado AANL está determinada no sólo por su concentración en plasma, sino también por las concentraciones plasmáticas de los otros AANL que compiten por su transporte al cerebro y por su afinidad por el transportador.

ANDERSON y col. (1990) junto con otros autores como FERNSTROM y col. (1987) ponen en duda la idea de que las concentraciones plasmáticas y cerebrales de AAR estén estrechamente relacionadas con la selección de la dieta por las ratas y las variaciones de la ingesta.

La última idea que se desprende de estudios realizados sobre la ingesta (BEVERLY y col., 1991), es que la concentración de aminoácidos esenciales que son suministrados en una dieta, influye en la síntesis de un código específico del genoma que sintetiza mRNA el cual, a su vez, codifica ciertas

proteínas necesarias para mejorar la anorexia y la aversión a dietas desequilibradas en aminoácidos. Por tanto, la ausencia o reducción de estas proteínas influye en la respuesta alimentaria con dietas desequilibradas.

Pese a todas las lagunas que se encuentran a la hora de justificar el tema que nos ocupa, lo que sí se puede concluir es que la ingesta proteica es controlada para mantener la concentración de aminoácidos esenciales en el cerebro dentro de unos límites muy concretos (1.5 y 2.3 nmol/g) (PETERS y HARPER, 1985) y este es el principal factor que decide sobre la cuantía de la ingesta proteica.

5.2.2.- Peso corporal

El estado nutricional viene determinado por diferentes parámetros entre los que destaca el peso corporal, ya que las variaciones que en él se producen son, tal vez, la parte más importante de la adaptación a cambios en la dieta (JAMES y SHETTY, 1982; JOLES y col., 1988).

El aumento del peso corporal (25% entre los días 4 y 14) que experimenta el lote control se ve apoyado por numerosos estudios (YU y col., 1982; FUJITA y col., 1984) que lo achacan al periodo de crecimiento que atraviesan los animales, que llegarían a un peso máximo, el cual disminuye en la última etapa de la vida debido, probablemente, a los cambios que se producen en el metabolismo energético corporal y a la disminución de la ingesta, más que a los producidos en el metabolismo proteico (ICHIKAWA y FUJITA, 1987). En este periodo de crecimiento se produce una mayor síntesis que catabolismo de proteínas (MILLWARD y col., 1975), lo cual lleva a pensar que si el crecimiento es consecuencia de una adecuada síntesis proteica, una pérdida de peso, normalmente, va acompañada de una privación de aminoácidos (SIDRANSKY y FARBER, 1958; SIDRANSKY y BABA, 1960; MERTZ, 1972; VELU y col., 1972; HARPER, 1974; CARMONA DA MOTA y col., 1990) y se producirá de forma severa en un corto periodo de tiempo, siempre en función del grado de deficiencia de la dieta y del tipo de aminoácido/s carente/s (D'MELLO y LEWIS, 1978).

La reducción de la ingesta que se produce en los lotes II y III de este experimento va acompañada de una disminución del peso corporal con respecto al

lote control (GRAFICA I), datos que concuerdan con los de CARMONA DA MOTA y col. (1990), SINGH y col. (1990) y RANA y MEHTA (1991).

Se producen descensos ponderales en dichos lotes el último día del experimento- días 14 y 8 respectivamente- del orden del 53% en el lote II y del 42% en el lote III. Estos valores, en principio, podrían explicarse por la pérdida de agua corporal que ocurre durante los 2 ó 3 primeros días de la administración de las dietas (MACDONALD, 1990), ya que se requieren todos los aminoácidos esenciales para el mantenimiento del agua corporal y se sabe que dietas carentes en metionina, isoleucina o treonina, además de cisteína, producen una pérdida de agua corporal en la misma proporción que aquellas libres de proteínas (D'MELLO y LEWIS, 1978). Pero pasado este tiempo hemos de buscar razones a nivel metabólico. Es sabido que la cisteína no es un aminoácido esencial ya que puede ser sintetizada a partir de la metionina en organismos sanos, pero se llega a convertir en esencial cuando la metionina es limitada en la dieta. En nuestro caso, hay una carencia tanto de metionina como de cisteína en las dietas de los lotes II y III, como ambos aminoácidos son partícipes de la síntesis proteica, se produce una reducción de la ganancia de peso y del balance de nitrógeno en los animales, como también sucede en sus experiencias a NEUHÄUSER y col., 1986; CHUNG y col., 1990. Según D'MELLO y LEWIS (1978) cuando un aminoácido esencial es omitido en la dieta el animal responde como si en esta hubiera carencia de todos los aminoácidos esenciales y aunque la experiencia demuestra que esta interpretación no puede ser tomada con toda rigurosidad ya que, por ejemplo, dietas libres de metionina o lisina producen menor pérdida de peso que dietas libres de proteínas, nos da idea de la importancia que tiene la calidad y cantidad de los aminoácidos de la dieta. Nuestros resultados se ven también apoyados en los experimentos de JABLONSKI y RAFALSKI (1984), quienes observan que la mayor pérdida de peso corporal se produce en ratas con dietas limitantes en isoleucina, treonina y aminoácidos azufrados, siendo similar a la producida con una dieta sin proteína, mientras que dietas limitantes en fenilalanina, leucina, triptófano, valina e histidina provocan una pérdida de peso menor que una dieta carente de proteína. La menor disminución de peso se produce con la dieta limitante en lisina.

Estudios recientes de Mc DONALD (1990) demuestran que la pérdida de peso corporal no está relacionada linealmente con la reducción de la ingesta

energética. La explicación a este hecho no está clara, ya que para otros autores como HENRIKSSON (1990), JACKSON y col. (1990) y SOARES y SHETTY (1991), una ingesta baja en energía ejerce una influencia negativa sobre el peso corporal, respondiendo el animal, para compensar, con una reducción del metabolismo basal y una menor actividad muscular para economizar glucosa.

Apoyándonos en estos datos y en los proporcionados por SANTI-DRIAN (1981) podríamos concluir que en nuestro experimento el hecho de que la pérdida de peso sea similar para los lotes II y III (lo que apuntaría por la escasa influencia de la ingesta energética sobre el parámetro en cuestión) se debe a la posibilidad de utilizar los aminoácidos aportados por la dieta III como fuente calórica. Ello reduce la necesidad metabólica de que el animal utilice sus propias proteínas corporales, explicando así el aumento observado en la excrección de urea y nitrógeno ureico.

Muy recientemente, MAES y col. (1991) y DONOVAN y col. (1991) encuentran una estrecha relación entre el estado de malnutrición proteico-calórica, un crecimiento deficiente y la hormona de crecimiento (GH) tanto en ratas como en humanos. Se piensa que la GH estimula el crecimiento porque promueve la síntesis de IGF (Insulin Like Growth Factor), el cual actúa en los tejidos principales estimulando la síntesis proteica y la proliferación celular. Como ya hemos citado, el retardo del crecimiento que causa la malnutrición depende de su severidad, duración y edad del animal y se piensa que es mediado, en parte, por la disminución en la concentración plasmática de IGF-I y el aumento en plasma de la GH, lo que induce a pensar a estos autores que este estado de resistencia a la GH viene producido por alteraciones en los receptores de la hormona (probablemente disminuye el número de los mismos) y por mecanismos postreceptores.

5.3.- BALANCE DE NITROGENO, UREA Y NITROGENO UREICO EN PLASMA, UREA Y CREATININA EN ORINA (TABLAS 2 Y 3)

5.3.1.- Balance de nitrógeno

Son antiguos y numerosos los estudios que demuestran que el primero y más claro signo de adaptación a una ingesta baja en proteínas que pone en marcha el organismo para mantener la masa proteica corporal, es el descenso en los valores del balance de nitrógeno (WATERLOW, 1986). Los valores obtenidos en el balance de nitrógeno de esta experiencia confirman lo indicado (GRAFICA II).

La administración de dietas carentes en aminoácidos esenciales, metionina y cisteína, conduce a una disminución del balance de nitrógeno por la gran pérdida corporal que se produce de este (NEUHÄUSER y col., 1986). Dicha pérdida excesiva de nitrógeno no es precisamente debida a que el organismo tenga cubiertas perfectamente sus necesidades, sino a la deficiencia de aminoácidos esenciales que produce disminución de la síntesis y aumento del catabolismo de las proteínas corporales.

HEGER y FRYDRYCH (1985), al administrar dietas con distintos niveles de aminoácidos esenciales, observan que la mayor pérdida de nitrógeno se produce en ratas alimentadas con dietas carentes de aminoácidos azufrados, seguida en orden decreciente por dietas carentes de valina, treonina, isoleucina, triptófano, aminoácidos aromáticos, leucina y lisina. Sin embargo, la intensidad con que desciende el balance de nitrógeno en este experimento es menor que la que atribuyen HEGER y FRYDRYCH, quizás debido al mayor peso de los animales utilizados por nosotros, con mayores reservas corporales de proteínas lábiles, que son movilizadas en situaciones de ayuno o deficiencia, principalmente por el hígado, piel y músculo.

Pero si la ingesta proteica hace variar el balance de nitrógeno, mayor influencia sobre él se ha visto que tiene la ingesta energética (CALLOWAY, 1975; CHEREL y LE MAHO, 1991). En el lote III se aunaron ambas situaciones, deficiencia de aminoácidos y de energía, observándose una caída en el balance de nitrógeno similar a la del lote II el día 4 pero mucho más severa en el día 8

llegando a un valor negativo. Dichos desequilibrios se asocian con un aumento en el catabolismo de proteínas, lo que conlleva a una disminución en la síntesis proteica. Si el grado de deficiencia calórica no es muy marcado y la reserva proteica es la adecuada, la pérdida inicial de nitrógeno corporal no es muy rápida y el animal se va adaptando a una ingesta calórica reducida y disminuye su actividad catabólica, tendiendo hacia un equilibrio del balance de nitrógeno (MORRISON y NARAYANA, 1967) y a una síntesis proteica adecuada (GARLICK y col., 1980). Sin embargo, si la restricción calórica es severa y la reserva proteica adecuada (MORRISON y NARAYANA, 1967) o incluso con una dieta carente en proteínas y baja en energía (GARLICK y col., 1980), se produce un aumento en el catabolismo de la grasa y las proteínas lábiles de reserva y un balance de nitrógeno negativo y el animal muere. Pero antes de alcanzar esta situación extrema, COX y col. (1953) ya señalan que incluso cuando la ingesta energética es baja, hay una cierta cantidad de proteínas que es utilizada para el anabolismo.

Esta secuencia típica de eventos caracterizada por una pérdida rápida de nitrógeno inicialmente, una adaptación y un daño irreversible, ha sido observada en perros, ratas (CALLOWAY y SPECTOR, 1955; ROSENTHAL y ALLISON, 1956) y humanos (SCHWIMMER y Mc GAVAK, 1948; CLARK y col., 1960).

Con el aumento del nivel del aminoácido deficiente en la dieta (HEGER y FRYDRYCH, 1985) o de las calorías (MORRISON y NARAYANA, 1967) se eleva la retención de nitrógeno, disminuyendo de forma gradual la respuesta al aproximarse el nivel del aminoácido estudiado al requerimiento óptimo.

Dentro de un cierto rango de ingesta, cada Kcal extra reduce la pérdida de nitrógeno urinario alrededor de 1.5 mg. Estas observaciones, originales de MUNRO (1951) y de CALLOWAY y SPECTOR (1954), siguen siendo confirmadas (WATERLOW, 1986) y produce un efecto ahorrador muy bien conocido en obesos (FORBES y DRENICK, 1979).

La adaptación de los animales, a la que anteriormente nos hemos referido, se ve reflejada en el lote II el día 14. No sucede así con los animales del lote III dado que han perecido antes de ese día.

5.3.2.- Urea y nitrógeno ureico plasmáticos, urea y creatinina en orina

Si de los datos obtenidos para el balance de nitrógeno se deduce que, en esta experiencia, se produce un aumento del catabolismo proteico y de aminoácidos, será lógico pensar que hay un aumento de metabolitos que contienen nitrógeno (urea, creatinina, ácido úrico y aminoácidos libres), tanto plasmáticos como urinarios. Este se refleja en las gráficas correspondientes.

Las reacciones de desaminación que se producen en los aminoácidos contribuyen a que se forme gran cantidad de amoníaco que si se acumulase sería altamente tóxico. La cantidad de amoníaco excretado es determinada por la necesidad de mantener el balance ácido-básico y tiende a ser baja con dietas que contienen proteínas vegetales, más que animales, porque producen menor cantidad de ácido. Para no alcanzar cuotas tóxicas, el amoníaco es reutilizado para la síntesis de aminoácidos. Al incorporarse a la glutamina, aspartato, glicina y carbamil fosfato, participa de forma indirecta en la síntesis de purinas, pirimidinas y porfirinas. La glutamina es el aminoácido más abundante en el organismo. Es sintetizada en muchos tejidos a partir del ácido glutámico y de amoníaco en una reacción dependiente del ATP. En el riñón, es de nuevo hidrolizada (a ácido glutámico y amoníaco) y el amoníaco es entonces excretado por el túbulo renal y eliminado por orina. Esta hidrólisis proporciona el 60%, aproximadamente, del amoníaco excretado en orina. Pese a todo, el papel exacto de la glutamina en el turnover proteico y en el metabolismo nitrogenado no se conoce (CERSOSIMO y col., 1986; FELIPO y col., 1991). Se sabe que el consumo de glutamina aumenta en varias situaciones catabólicas (SOUBA y col., 1985).

De acuerdo con estudios de CERSOSIMO (1985, 1986) y de FELIPO y col. (1991) la necesidad de ahorrar amoníaco en situaciones de ayuno conlleva a un descenso de glutamina en plasma y glóbulos rojos, al ser esta capturada por tejidos como intestino y riñón. Ello favorece la captura de amoníaco por el músculo esquelético y la síntesis de glutamina frente a la de alanina.

Pero la vía más importante en mamíferos por la que es eliminado el amoníaco es el ciclo de la urea. La urea es el principal compuesto nitrogenado procedente del catabolismo de los aminoácidos (KANG y col., 1987). En 1924, BOLLMAN y col. demuestran que el hígado es el lugar más importante de

formación de la misma, pero estudios más recientes, indican que una pequeña cantidad también se forma en el cerebro y en otros tejidos como riñón, intestino, músculo esquelético, pancreas, células sanguíneas circulantes...

La producción de urea refleja las alteraciones en la ingesta proteica dietaria y en el patrón de utilización de aminoácidos (HARPER y col., 1970). Siempre que no esté comprometida la función renal, la concentración plasmática de urea se relaciona con la síntesis de la misma. En este sentido se ha señalado en ratas (BOOTH y SIMSON, 1971, 1974; FELIPO y col., 1991) y rumiantes (LEUNG y ROGERS, 1969) una relación directa con la ingesta proteica e inversa con la calidad de la proteína. Hemos de considerar las diferencias observadas en la concentración de nitrógeno ureico plasmático entre animales alimentados con dietas que contienen una mezcla de aminoácidos cristalinos y aquellos a los que se les administra dietas con caseína suplementadas de aminoácidos, siendo detectada una mayor absorción de aminoácidos acompañada de un mayor nivel en el nitrógeno ureico plasmático en el primer caso (KANG y col., 1987).

Estudios en ratas (STEPHEN, 1968a) y niños (STEPHEN, 1968b) muestran que una reducción en la actividad del ciclo de la urea va acompañada de un aumento en las amino-acil-t-RNA-transferasas para así incrementar la producción de proteínas. Una situación contraria se produce en este experimento, en el que por falta en la dieta del aminoácido iniciador de la síntesis proteica-metionina- se colabora a un aumento del catabolismo proteico intracelular y a una degradación oxidativa de los aminoácidos ingeridos en la dieta, con lo que se desencadena una elevación de la actividad del ciclo de la urea. Es así, como encontramos unos valores de urea (GRAFICA II), tanto plasmáticos como urinarios, muy aumentados respecto a los controles, sucediendo de igual modo en los valores plasmáticos de nitrógeno ureico, de acuerdo con JACKSON y col. (1990). Se apoyan así las afirmaciones que apuestan por un aumento en las concentraciones de urea plasmática durante la deficiencia de aminoácidos esenciales, tanto en perros (LOULLIS y col., 1978) como en ratas (HARPER y col., 1970; NODA y CHIKAMORI, 1976) y hombres (MELIZA y col., 1981, 1983), aumento que ha sido también descrito en situaciones de ayuno (NOMANI y col., 1989) y en el caso de la administración de dietas libres de proteínas (FELIPO y col., 1991).

En cuanto a la creatinina hay que recordar que se trata de un metabolito anhidro formado a partir de la creatina y es excretado por orina. La creatina es sintetizada en el hígado y depositada en el músculo en forma de fosfato de creatina (GANONG, 1968) que constituye un almacén de energía, la cual, cuando es necesaria, se libera en forma de ATP. Sólo una pequeña parte de creatina es eliminada como tal (PERLSTEIN, 1977).

La excreción de creatinina sufre variaciones en un individuo en función de la masa muscular (KIRK y WALKER, 1976), elevándose cuando esta se degrada en situaciones de infección, trauma o malnutrición (WATERLOW y col., 1972; SANTIDRIAN, 1981).

Estos valores elevados de creatinina que pudieran esperarse en los animales, no se producen, tal vez debido al hecho, esencial en el experimento, de administrar dietas carentes en aminoácidos azufrados durante la etapa de crecimiento, viéndose primeramente afectada la síntesis proteica frente a la degradación e impidiéndose el crecimiento muscular que les correspondería. De este modo, los aminoácidos dietarios al no ser utilizados en la síntesis proteica, servirán a las ratas de fuente energética lo que reduce la necesidad de utilizar sus propias proteínas corporales (SANTIDRIAN, 1981). Nosotros, al igual que RIKIMARU (1989), no podemos decir que haya una diferencia significativa en la degradación de proteína muscular entre ratas alimentadas ad libitum y ratas con restricción energética. Sin embargo, también como ellos, podemos concluir que el catabolismo proteico muscular tiende a disminuir como mecanismo protector cuando la ingesta alimentaria es limitada, por lo cual, la creatinina no aumenta significativamente. Hay observaciones que muestran que la restricción energética causa una disminución del catabolismo proteico muscular (WATERLOO y col., 1978), mientras que otras indican que no influye (NISHIZAWA, 1983). Estos resultados diferentes pueden ser debidos a las distintas condiciones experimentales en cuanto al periodo en el que se limita el alimento, la edad, el depósito de grasa y el nivel de ingesta proteica.

5.4.- COLESTEROL, GLUCOSA E INSULINA PLASMATICOS (TABLA 4)

5.4.1.- Colesterol

La homeostasia del colesterol es bien sabido que depende de la compleja interacción entre la edad y el turnover de colesterol y proteínas dietarias.

A medida que aumenta la edad en un individuo, el turnover de colesterol se reduce lo que conduce a una elevación del nivel de colesterol sérico (KRITCHEVSKY, 1980). Sin embargo, este efecto puede ser manipulado por ácidos grasos poliinsaturados de la dieta (CHOY y SUGANO, 1988). Además, el efecto de la calidad y cantidad de la proteína dietaria sobre el metabolismo del colesterol parece depender del colesterol dietario (EKLUND y SJÖBLOM, 1986). A ello se añade que las proteínas de la dieta modifican la producción de ácidos grasos (fosfolípidos y eicosanoico) de los tejidos (HUANG y col., 1986; SUGANO y col., 1988), proceso influido también por la edad (BRENNER, 1981).

Nuestras investigaciones van dirigidas al efecto sobre el metabolismo del colesterol que se desprende del consumo de dietas carentes en aminoácidos azufrados. Es así como se obtienen unos datos (GRAFICA III) que inician en la gran importancia que hay que darle a la calidad y tipo de la proteína sobre el nivel plasmático de colesterol y que ya apuntaba EKLUND y SJÖBLOM (1986), aunque el mecanismo de acción no es bien conocido.

Alrededor de los años 60 surgen trabajos, aún hoy muy considerados, de autores preocupados por el tema. Así, FILLIOS y MANN (1954) señalan la acción reductora del colesterol que tiene la metionina en animales alimentados con dietas deficientes en metionina o de bajo contenido proteico como apunta LEVEILLE y col. (1962). Este último grupo también observa que cuando la metionina se añade a dietas con un contenido proteico adecuado su acción disminuye.

En este sentido, SUGIYAMA y col. (1986b) administrando dietas con un 10% de caseína, observan que al adicionar un 0.75% de metionina, el nivel de colesterol se reduce, mientras que si el contenido de caseína es de 25 ó 50%, el efecto producido por la metionina es contrario (SUGIYAMA y col., 1985).

SUGIYAMA y col. (1986a), señalan también que dietas altas en metionina y bajas en cisteína conducen a un nivel plasmático de colesterol alto, mientras que dietas bajas en metionina y altas en cisteína producen un efecto contrario. El efecto hipocolesterolémico, según este autor, probablemente esté mediado por el glutatión (SUGIYAMA y col., 1987) ya que este aumenta la síntesis de triyodotironina y los niveles de las hormonas tiroideas en el plasma (SUBERVILLE y col., 1988), las cuales reducen el colesterol sérico (SCHOLZ-AHRENS y col., 1990).

Se piensa, por otro lado, que si la metionina posee dos vías metabólicas, transulfuración y transmetilación (COOPER, 1983; BENEVENGA, 1984), probablemente la responsable del efecto hipercolesterolémico es la vía de transulfuración (la transmetilación incluso disminuye el nivel de colesterol). Considerando además, que los dos isómeros de la metionina, D y L, tienen la misma acción sobre el nivel de colesterol plasmático.

Por otro lado, compuestos como la betaína, colina e histidina, al igual que la metionina, ejercen un efecto hipercolesterolémico (SUGIYAMA y col., 1986b). Como la betaína y la colina se pueden sintetizar en el hígado a partir del grupo metilo de la metionina que surge de su transulfuración, se ha pensado que la metionina eleva el colesterol plasmático gracias a su grupo metilo (SEIDEL y col., 1960; SUGIYAMA y col., 1986b).

Sin embargo, grupos metilados como S-metil-L-cisteína y N,N-dimetil-glicina, no elevan el colesterol plasmático, quizá por no poder entrar en la vía de transulfuración (LOMBARDINI y col., 1970).

Se debe considerar también que la parte no metilada de la molécula de metionina reduce los niveles plasmáticos de colesterol, al igual que lo hacen sus derivados no metilados (homocisteína y cisteína) y la taurina. Sin embargo, el efecto hipocolesterolémico de la porción no metilada no es tan fuerte como el hipercolesterolémico del grupo metilo (SUGIYAMA y col., 1986b).

La glicina acelera el metabolismo de la metionina (MURAMATSU, 1984) aceptando el grupo metilo de la S-adenosil-metionina y provocando también un aumento en la excreción urinaria de taurina y cisteína, lo que hace que su

efecto sea hipocolesterolémico incluso con la presencia en la dieta de metionina, betafina o histidina (SUGIYAMA y col., 1986b; TANAKA y SUGANO, 1989). Esta propiedad de contrarrestar la acción tóxica hipercolesterolémica de la metionina, que presenta la glicina, también es llevada a cabo por la serina.

La importancia que algunos autores dan a la relación Arg/Lys para la regulación del nivel de colesterol, ha sido desmentida recientemente (TANAKA y SUGANO, 1989).

También cabe señalar que aunque se ha dicho que la proteína animal comparada con la vegetal, suele contener mayor cantidad de metionina, hay que considerar que la proteína vegetal generalmente presenta un nivel de cisteína relativamente más alto, lo que contribuye al efecto hipocolesterolémico. También es importante tener en cuenta que algunas proteínas animales, tales como la albúmina y la proteína sérica, contienen un alto nivel de cisteína y por tanto disminuyen el colesterol sérico o plasmático pese a su origen animal. Es por ello, por lo que no siempre hemos de interpretar la proteína animal como hipercolesterolémica y la vegetal como hipocolesterolémica (SUGIYAMA y col., 1986a).

Todas estas observaciones sobre la influencia de la metionina en el nivel de colesterol plasmático, aceptadas durante mucho tiempo, hoy se vuelven a poner en duda cuando TANAKA y SUGANO (1989), apoyándose en sus propias observaciones y en las llevadas a cabo por YAGASAKI y col. (1986), piensan que la metionina es hipercolesterolémica cuando a los animales se les administraba dietas con caseína enriquecidas con colesterol, pero es hipocolesterolémica cuando a dichas dietas no se les añadía colesterol.

En nuestras dietas, libres de colesterol y constituidas por una mezcla de aminoácidos cristalinos, la ausencia de metionina y cisteína ejerce un efecto hipocolesterolémico. Observaciones recientes (RIKIMARU y col., 1988) aseguran que una restricción energética disminuye ligeramente los niveles plasmáticos de colesterol.

Finalmente, se debe destacar la correlación positiva observada por SUGANO y col. (1982) entre la concentración de insulina plasmática y el nivel de

colesterol sérico. Ambos parámetros bioquímicos se detectan en descenso en este trabajo, lo cual apoya las investigaciones de SUGANO.

Así, de este trabajo y otros muchos, se desprende la hipótesis de que la regulación del nivel de colesterol se encuentra directamente relacionada con mecanismos hormonales e indirectamente con las concentraciones de aminoácidos.

5.4.2.- Glucosa e insulina

La homeostasia de la glucosa es mantenida por la insulina, el glucagón y las catecolaminas (WEEKES, 1986). Pero la edad, tanto en roedores como en el hombre, también ejerce su papel. Así, una edad avanzada está asociada a una marcada disminución de tolerancia a la glucosa (disminuye la secreción de insulina estimulada por la glucosa), incluso en situación de restricción calórica, debido, probablemente, a la menor funcionalidad de las células beta del páncreas (WANG y col., 1988) y/o a influencias medioambientales (dieta, ejercicio...) (Mc DONALD, 1990). CRACE y col. (1989) también hablan de la influencia del sexo (mayor en machos que en hembras) sobre la tolerancia a la glucosa, refiriéndose sólo al ser humano, ya que en roedores, concretamente en ratas, no aparece descrito en la literatura.

Los animales que utilizamos pasan por una etapa de crecimiento y desarrollo, lo que hace pensar en una funcionalidad metabólica máxima. Las causas que hacen variar los valores de glucosa e insulina hemos de buscarlas en las condiciones dietarias experimentales impuestas. En la GRAFICA III se destaca la escasa variación de los valores de glucosa plasmática de los lotes II y III respecto al control. Así mismo se muestra como a lo largo de la experiencia se detecta un descenso significativo de los niveles de insulina plasmática, menos apreciable el día 4.

Estos datos dan idea, una vez más, de que el nivel de insulina se reduce por una malnutrición severa o ayuno. Generalmente ambas situaciones van asociadas con una hipoglucemia e hipoinsulinemia (PUGLIESE, 1990).

La ausencia de descensos significativos de la glucosa plasmática en esta experiencia podría tener su origen en el corto periodo que duran los

tratamientos para los lotes II y III. En este tiempo, el organismo de las ratas se sirve de las reservas de glucógeno hepático y de los aminoácidos de cadena ramificada del músculo esquelético y de los ingeridos para mantener la glucemia dentro de un intervalo aceptable. Pues es bien conocido que la degradación de aminoácidos de cadena ramificada en el músculo esquelético se ve potenciada en estados catabólicos como el ayuno y la diabetes (BUSE y col., 1973), utilizándose en la formación de alanina, que es el principal precursor aminoacídico de la gluconeogénesis en el hígado (FELIG y col., 1970). Se observa, así mismo, que el lote III, que fue sometido a una restricción calórica mayor que el lote II, también mantiene sus valores de glucosa. Y es que, según CROWE y ROYLE (1988) y CRACE y col. (1989), las variaciones en el metabolismo de la glucosa dependen más de una deficiencia proteica que de una deficiencia calórica. De este modo, una hipoglucemia aparecería en un estado terminal de malnutrición (PUGLIESE, 1990) y es lo que ha podido suceder en las ratas del lote III que han muerto sin llegar al catorceavo día experimental.

Por otro lado, OKITOLONGA y col. (1987) y BAJAJ y RAO (1987) afirman que con malnutrición proteico-energética se puede inducir un daño persistente en las células beta del páncreas, deteriorando su función y número y provocando una menor liberación de insulina. Ante tal situación, los tejidos se hacen más sensibles a la hormona, lo que está en favor del mantenimiento de los valores de glucosa plasmática durante un primer periodo, pasado el cual, el efecto (daño celular) sería máximo y podría llegarse al desarrollo de una diabetes (OKITOLONGA y col., 1987; BAJAJ y RAO, 1987). En este sentido hay que subrayar que MAK y col. (1986) no están del todo de acuerdo, ya que para ellos cuando aparece una elevación de la uremia, aumenta la resistencia a la insulina, de forma que, al disminuir los niveles de insulina, la sensibilidad de los tejidos a esta hormona se hace mayor. Así el nivel de glucosa sanguínea se mantiene gracias a que predomina la resistencia a la insulina frente a la sensibilidad de los tejidos a esta. Son estos últimos, datos que coinciden, apoyan y justifican nuestros resultados.

Sobre estos comentarios se debe destacar que hoy el efecto de la malnutrición sobre la respuesta de la insulina a la glucosa se ve más relacionado con cambios en los receptores de insulina que en las células beta del páncreas. PAYNE-ROBINSON y col. (1990) indican al respecto que las proteínas de la dieta

modulan las propiedades de los receptores de insulina. Así, dietas bajas en proteínas conducen en ratas a un debilitamiento de la tolerancia a la glucosa (HEARD, 1986), lo que hace pensar que dietas altas en proteínas aumentan la sensibilidad a la insulina. Ello facilita la existencia de una relación positiva entre la ingesta de proteínas y la insulina unida a sus receptores y entre la ingesta de proteínas y el número de lugares de unión de los receptores. Así, THAKUR y col. (1988) observa en hepatocitos de ratas malnutridas, que la afinidad de la insulina por sus receptores disminuye aunque el número de lugares de unión aparece más alto.

Hay que apuntar también que si la insulina favorece la penetración y utilización intracelular de glucosa en músculo y tejido adiposo (debe tenerse en cuenta que la entrada de glucosa en la célula hepática y cerebral no requiere insulina) y aumenta la formación de glucógeno en hígado y la lipogénesis a nivel adiposo y hepático (SCHÜLER, 1980a), una disminución de los valores de insulina producirá efectos contrarios que pueden favorecer la estabilidad del nivel de glucosa en un primer periodo por las reservas de glucógeno muscular y hepático.

Considerar que el nivel de insulina está en función de la severidad del tratamiento y del tiempo que este dure, no es algo novedoso si nos remitimos a las observaciones realizadas por LUNN y col. (1973). Nosotros encontramos que el día 4 de la experiencia la insulina plasmática no sufre alteración en los lotes II y III respecto al lote control, aunque a medida que pasan los días se detectan descensos cada vez más significativos. Así mismo, se puede observar la influencia del tratamiento, de manera que el lote III aparece con un nivel más bajo de insulina que el lote II debido a la restricción calórica.

La insulina, además, juega un importante papel en la regulación del metabolismo proteico, favoreciendo la entrada de aminoácidos en las células y la síntesis de proteínas, de RNA y de DNA en músculo, hígado y tejido adiposo, aun en ausencia de glucosa. Al ser capaz de disminuir la neoglucogenia hepática, aminora los requerimientos hepáticos de aminoácidos y la liberación de aminoácidos desde el músculo, facilitando así la síntesis proteica muscular. A falta de insulina decrecen la formación de polisomas y los ribosomas trasladan peor el RNAm, lo que va en detrimento de la síntesis proteica (SCHÜLLER, 1980a; FLAKOLL y col., 1989).

Paralelamente, la actuación de la insulina está en función de la disponibilidad de aminoácidos, de modo que una hipoaminoacidemia conlleva, por sí misma, a un aumento de la proteólisis y en ello la insulina no puede ejercer su efecto como antiproteolítico por falta de sustrato para la síntesis proteica (FLAKOLL y col., 1989; PAYNE-ROBINSON y col., 1990). En nuestra experiencia, en que se aunan la falta de insulina y de aminoácidos azufrados se hace casi imposible la síntesis proteica, con lo que los animales llegan a tener un pronóstico fatal. A tal fin también colabora en el lote III el hecho de que sean sometidos los animales a una deficiencia energética del 50% movilizándose los ácidos grasos con el fin de paliar el efecto producido por la falta de insulina y glucosa y produciéndose cuerpos cetónicos a partir de los mismos, por lo que desciende el pH sanguíneo y se eleva la toxicidad (FREXES-STEED y col., 1990).

Por último, y coincidiendo con CRACE y col. (1989) podemos afirmar que hay una clara relación entre hipoinsulinemia y retardo en el crecimiento.

5.5.- PROTEINAS TOTALES Y FRACCIONES PROTEICAS PLASMATICAS (TABLA 5)

Son muchos los estudios que han demostrado que los aminoácidos dietarios y la ingesta energética son de gran importancia en el mantenimiento de las proteínas plasmáticas.

Así, la alimentación que incluye proteínas de baja calidad, conduce a un descenso de la actividad ribosomal, lo cual conlleva una marcada disminución de la síntesis proteica. Este es el caso claro de dietas deficientes en metionina (MARTINEZ y col., 1987).

Los resultados de este trabajo aportan al respecto que al someter a los animales a una dieta carente de metionina y cisteína se reduce la ingesta alimentaria, como ya se ha comentado, y todo ello desencadena un descenso del 20% de los niveles plasmáticos de proteínas a partir del día 8 de la experiencia. El día 4,

los valores proteicos no son significativos respecto al lote control. Pese a que RIKIMARU y col. (1988) ven claramente como disminuyen los niveles proteicos plasmáticos en animales sometidos a una restricción energética, nosotros no detectamos diferencia significativa entre el lote II y el lote III, sometido a un déficit energético. Ello pudiera ser debido al largo periodo con el que trabaja RIKIMARU comparado con los 20 días de nuestra experiencia. Pues creo de interés citar que el trabajo de este equipo es uno de los pocos que se han realizado a largo plazo.

Al ser la albúmina una de las proteínas más abundantes en plasma, su variación es una clara consecuencia de una adaptación en el turnover proteico (WATERLOW, 1986). Es por ello considerada como uno de los mejores índices de malnutrición proteico-calórica (FAUS y col., 1984). Pero la modificación de la albúmina plasmática en esta experiencia no se detecta muy intensa, tan sólo se aprecia una ligera reducción del 34% el último día en el lote II respecto al control. Estos resultados pueden explicarse si se comparan con los encontrados por JAMES y HAY (1968) quienes, muy elegantemente, muestran en niños con malnutrición proteica una caída rápida de la síntesis de albúmina seguida de un retraso en dicha síntesis debido a que disminuye su catabolismo y al paso de albúmina del compartimento extravascular al intravascular, resultando del proceso un mantenimiento de la masa de albúmina circulante intravascular. De forma similar HOFFENBERG y col. (1966), en experimentos con adultos, muestran como al disminuir su ingesta proteica se produce un descenso del 36% del turnover de albúmina con una disminución de sólo el 7% en la concentración de albúmina plasmática. Más recientemente, YAP y HAFKENSCHIED (1981) observan un descenso en la tasa de síntesis de albúmina después de un periodo breve de ayuno y JOLES y col. (1988) lo detectan durante la deficiencia proteica. La posibilidad de que la reducción en la síntesis de albúmina se deba a un descenso en la disponibilidad directa de aminoácidos para su síntesis en el hígado es rechazada por YAP y HAFKENSCHIED (1981), quienes indican que debe estar implicado otro mecanismo en el cual estos aminoácidos no pueden ser captados por otros polirribosomas para la síntesis de albúmina. Sin embargo, es un hecho que los aminoácidos pueden regular la producción de proteínas plasmáticas por los hepatocitos. SMITH y LUNN (1984), observan un descenso en la síntesis de albúmina por hepatocitos de rata aislados si el medio es deficiente en aminoácidos esenciales. Por su parte, MONTOYA y col. (1987), también en cultivo de hepatocitos, señalan que la presencia de aminoácidos esenciales a concentraciones

plasmáticas estimula la síntesis de albúmina y transferrina, siendo los aminoácidos de cadena ramificada responsables del 50% de este efecto. Mientras TANAKA e ICHIARA (1983) proponen la existencia de dos "pools" de aminoácidos en estas células, el endógeno, originado por degradación lisosomal de las proteínas intracelulares y el exógeno, relacionado con la formación tanto de proteínas intracelulares como plasmáticas.

En cuanto a la influencia que podría presentar una deficiencia energética dietaria sobre el nivel de albúmina plasmática, recientes estudios de SCALFI y col. (1987) y AUSMAN y col. (1989) confirman que la tasa de albúmina no cambia durante el tratamiento con restricción energética y proteica respecto a experiencias realizadas con tan sólo limitación proteica.

Estos datos apoyan de forma decisiva nuestros resultados en los que no se detectan variaciones significativas en el lote III respecto al lote II.

De este modo LUNN y AUSTIN (1983) y AUSMAN y col. (1989) consolidan la idea de que la restricción energética tiene un efecto de algún modo protector y una hipoalbuminemia aparece más rápidamente con dietas altas en calorías y pobres en proteína.

Más recientemente VELLAS y col. (1990) relacionan malnutrición y muerte y encuentran en humanos malnutridos descensos en el nivel plasmático de proteínas y prealbúmina.

Durante la malnutrición, muchos autores (WATERLOW, 1986) han descrito un mantenimiento de los valores de las inmunoglobulinas circulantes. Otros señalan bajas concentraciones de alfa y beta-globulinas en el suero de enfermos con kwashiorkor (WHITGHEAD y col., 1973).

Nuestros datos hacen que nos inclinemos a pensar que una malnutrición proteico-calórica por falta de aminoácidos azufrados y energía, no proporciona alteraciones de los valores de globulinas circulantes en un primer periodo, después del cual encontramos una ligera reducción de las beta-globulinas en los lotes II y III respecto al control de un 31 y 41% los días 4 y 8 de la experiencia lo que

induce a creer que es a partir de esos momentos cuando realmente se comienzan a detectar a este nivel los primeros signos patológicos.

En resumen, los descensos significativos que se producen en los niveles de albúmina y beta-globulina coinciden con los resultados obtenidos por COWARD y col. (1972) en niños malnutridos. Para estos autores, las primeras modificaciones que se producen en el patrón de las proteínas plasmáticas podrían ser simplemente una respuesta de tipo homeostático, sólo las alteraciones que tienen lugar con posterioridad pueden ser el resultado de un metabolismo anormal, aunque es difícil saber cuando finaliza la adaptación dando lugar a la patología.

5.6.- EFECTO DE LA CARENCIA DE MET+ CIS Y MET+ CIS Y ENERGIA SOBRE EL CRECIMIENTO CEREBRAL (TABLAS 6,7,8,9,10,11,12,13)

5.6.1.- Modificaciones en el peso del cerebro, peso del cerebro/peso corporal y proteínas solubles del mismo (tabla 6)

Los efectos producidos por una deficiencia proteico-energética en la alimentación animal dependen esencialmente de la edad del animal, de la calidad de la proteína de la dieta y del tiempo de duración del tratamiento (PLATT y col., 1964; MURILLO y col., 1991; CHEREL y col., 1991). Según hace alusión RUDY y CASTRO (1990) por un lado, y CHEREL y col (1991) por otro, los animales más jóvenes se ven más afectados por su historia nutricional que aquellos de edad mas avanzada. Ello se ve muy bien reflejado en el crecimiento del animal y de sus órganos. En el apartado correspondiente ya se discutió cómo y porqué, en éste experimento, en las ratas se ha producido una disminución de su peso corporal y crecimiento normal, respecto al lote control. Ya MERTZ en 1972 afirma que ante una malnutrición el organismo reacciona preservando los tejidos con mayor tasa metabólica, tejidos viscerales y cerebro (el hígado aunque es un tejido visceral de alto metabolismo, es una excepción dentro del grupo, ya que su contenido proteico disminuye), mientras que tejidos con bajo metabolismo, tejido muscular y piel, aun siendo más abundantes, son los que más desgaste presentan. Estos resultados han

sido demostrados no sólo en la rata, sino también en el mono y en el hombre y se ven apoyados por las observaciones de PERRY y col. (1986) y MURILLO y col. (1991).

En las ratas, durante el periodo perinatal, se produce el desarrollo básico del cerebro, proliferación de las células de la glía, formación de sinapsis (sinaptogénesis), cambios neuroquímicos (GONCALVES y col., 1990). La rata al nacer tiene su cerebro casi completamente mielinizado, a diferencia de lo que sucede en el hombre (PORTMAN y col., 1987). Durante los 21 días siguientes al nacimiento, se termina en estos animales la síntesis de DNA, y por tanto, la división celular en el cerebro. Las proteínas totales continúan aumentando hasta los 99 días de vida, cuando el cerebro alcanza su tamaño máximo, después continúa la acumulación de lípidos (FISH y WINICK, 1969b). Sin embargo, estudios más detallados revelan que las diferentes regiones cerebrales tienen su propio ritmo de desarrollo, tanto en ratas como en humanos.

En el hombre, aunque no se cuenta con estudios tan detallados, se sabe que el periodo crítico de máximo desarrollo cerebral parece extenderse desde el último trimestre de gestación hasta que finaliza el primer año de vida (CASTRO y col., 1989). Aparecen neuronas durante la vida intrauterina y las células de la neuroglia se multiplican después. Comparado con el resto del cerebro, el cerebelo tiene un crecimiento más rápido. La mielinización se refleja en el contenido de colesterol cerebral (PASSMORE y EASTWOOD, 1986) y parece sufrir alteraciones después de un estado de MPE, según CORNBATH y BROWN (1988) que trabajan con ratas de raza Wistar que sufren MPE.

En resumen, el crecimiento normal celular del cerebro de mamíferos se produce en una fase proliferativa temprana en la cual predomina la división celular y la cantidad de proteínas y lípidos se mantiene relativamente constante. Durante este tiempo el cerebro es muy sensible a las condiciones medioambientales tales como el estado nutricional (GONCALVES y col., 1990), de manera que una malnutrición produce en el cerebro cambios a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico que persistirán durante la vida adulta (CASTRO y col., 1989; ISHIMURA y col., 1989).

Hemos de destacar para una buena interpretación y aplicación de los resultados que, dado que el cerebro de rata al nacer se encuentra casi completamente mielinizado, lo que no ocurre en el hombre, ante una MPE durante la vida postnatal, el cerebro de rata será menos sensible que el humano (PORTMAN y col., 1987). La sensibilidad de la rata en tales condiciones de malnutrición será máxima cuando esta se impone durante los 21 primeros días de vida (CASTRO y col., 1989). Pese a todo ello, se dispone de datos para afirmar que los efectos de la malnutrición sobre el cerebro humano y de ratas son similares.

El crecimiento de órganos primeramente es producido por un aumento en la síntesis de DNA y proteínas, en la misma proporción, lo que se traduce en una división celular y aumento del número de células, aunque estas se mantienen con un tamaño constante. La síntesis de DNA y la división celular, más tarde, continúan produciéndose, aunque algo mas lentas, mientras que la formación de proteínas se continúa dando en la misma proporción, lo que hace aumentar la relación proteínas/DNA a partir del día 21 en la rata, cuando la síntesis de DNA ha concluído. Seguida a esta fase denominada de hiperplasia, aparece la llamada fase de hipertrofia en la que las células individuales se hacen más grandes. Cuando se examinan los experimentos de McCANCE y WIDDOWSON (1962) con animales malnutridos se ve claro que si la malnutrición se impone durante la fase proliferativa de crecimiento (21 primeros días de vida) la división celular es más lenta, reduciéndose el número de células cerebrales, lo que conlleva a una disminución en el contenido de DNA, RNA, síntesis proteica, tamaño celular, contenido enzimático, mielinización y peso del cerebro (SERRA y col., 1982; SINGH y col., 1990). Por tanto el órgano tendrá un tamaño pequeño porque dispone de pocas células. Estos cambios se hacen permanentes e irreversibles. Sin embargo, si la malnutrición en la rata se impone pasados los 21 primeros días críticos después del nacimiento, se acorta el crecimiento celular pero con una rehabilitación nutricional adecuada las células tornan a su tamaño normal.

Apoyándonos en estas experiencias nos es posible hacer una interpretación de nuestros resultados. Nosotros, utilizando ratas alimentadas con dietas carentes en met+cis y met+cis y la mitad de energía cuando ya ha pasado la época crítica de crecimiento y desarrollo cerebral (más de 44 días), no llegamos a obtener variaciones significativas del peso cerebral respecto al lote control (GRAFICA IV), de acuerdo con CHEEK y col. (1976) y con MEHTA y col.

(1981) en estudios en monos Rhesus con MPE. Ello es debido a la tendencia que tiene el organismo a preservar órganos vitales ante una MPE. Aunque si vemos que los efectos de tal deficiencia comienzan a hacerse visibles el día 14, último día de la experiencia, en que los animales del lote II disminuyen en un 33% su peso cerebral y los del lote III llegan a morir, de acuerdo con los estudios de PORTMAN y col. (1977) realizados en monos Rhesus sometidos a MPE y con los realizados por PASSMORE y EASTWOOD (1986). Y es que, si bien la carencia de aminoácidos azufrados (especialmente de metionina) (MARTINEZ Y COL., 1987) o las proteínas de baja calidad (RIKIMARU y col., 1978; MILLWARD y WATERLOW, 1978) se pueden relacionar con una marcada disminución de la síntesis proteica, la captura de metionina por el cerebro no se ve afectada por los cambios en el nivel de aminoácidos circulantes en sangre y el ayuno durante una semana no afecta a la captura de metionina por el cerebro (MÉREI y GALLYAS, 1964).

Si el peso del cerebro se mantiene en los animales experimentales aproximadamente igual al de los controles y sin embargo el peso corporal disminuye de acuerdo con MURILLO y col. (1991), es lógico que la relación peso del cerebro/peso corporal, denominada índice cerebrosomático, se vea aumentada en los lotes II y III respecto al lote control, los días 4 y 8 de la experiencia.

Curiosamente, se vuelve a poner de manifiesto el día 14 de la experiencia en el lote II la clara disminución del peso cerebral, haciendo que se mantenga el índice cerebrosomático del lote II este día respecto al control.

Por otro lado, aunque el metabolismo de proteínas parece ser más estable en el cerebro que en otros órganos, también sufre ciertas variaciones dependiendo de numerosos factores como la fase de desarrollo en la que se encuentre y ello se ve reflejado de forma diferente en cada proteína y en cada zona cerebral. Es sabido que la síntesis y degradación proteica se produce en mayor proporción en un cerebro en fase de desarrollo que en el tejido adulto (LAJTHA y col., 1987; CHEREL y col., 1991). Cuando una malnutrición afecta al cerebro, en primer término se inhibe la síntesis proteica, lo que conlleva una disminución de la degradación de proteínas para así preservar la supervivencia del cerebro. Algo muy diferente sucede en el músculo e hígado. Otro mecanismo alternativo sería el transporte activo de aminoácidos al cerebro para así mantener el nivel de

aminoácidos en el adulto (no en cerebro en desarrollo). La vulnerabilidad del metabolismo de proteínas en el cerebro en desarrollo está más relacionada con la división celular de las neuronas que con cambios en el pool de aminoácidos (TOTH y LAJTHA, 1980). En los animales de experimentación, que presentan un estado de crecimiento con su cerebro ya formado, el contenido proteico tanto en el lote II como en el III disminuye el último día de la experiencia (GRAFICA IV). Ello podría ser debido a una inhibición de la síntesis proteica por falta de met y cis, pese a tener una tasa de aminoácidos esenciales igual o superior al lote control. Ello se cree que provoca una disminución de la síntesis proteica a nivel de las células de la glía, descendiendo por este motivo el contenido proteico soluble.

El resto de los días (4 y 8) no hay variaciones en las proteínas cerebrales respecto a los controles. Ello coincide con los resultados obtenidos por CHEREL y col. (1991) en condiciones de ayuno. Y es que, según estos autores, el cerebro bajo cualquiera de estas condiciones tiende a ahorrar proteínas, a diferencia de las pérdidas que se producen en otros órganos como músculo esquelético, hígado y tracto gastrointestinal.

La restricción energética impuesta en el lote III ejerce su efecto, según muestran los resultados, al provocar unos niveles proteicos menores en relación al lote II.

5.6.2.- Variaciones en el DNA, proteínas/DNA, número de núcleos, tamaño celular y actividad DNAsa ácida (tablas 7 y 8)

El contenido de DNA cerebral en mamíferos es proporcional a la densidad de células (NAKAHARA y col., 1990) y como ya hemos comentado, la malnutrición conduce a una disminución de DNA y en general de ácidos nucleicos (SERRA y col., 1982; SINGH y col., 1990). En los animales de experimentación se observan variaciones significativas en el contenido de DNA a lo largo de la experiencia (GRAFICA V), de tal modo que el día 4 hay una elevación del contenido de DNA en ambos lotes carentes. Ello podría ser causado por la disminución del contenido proteico del órgano, como se observa en la relación proteínas/DNA (GRAFICA VI). Esta idea es confirmada por el aumento paradójico del número de núcleos (GRAFICA VI) y la disminución del tamaño celular (aunque la estadística no lo considera una disminución significativa). El día 8 no se

observan diferencias significativas en el contenido de DNA y el día 14 aparece un descenso del 51% respecto del lote control. Estos valores se correlacionan con la relación proteínas/DNA, número de núcleos y tamaño celular, como bien muestra SINGH y col. (1990).

Por otro lado, como se muestra en la gráfica V, la DNAsa ácida del cerebro, al ser de naturaleza proteica, tiende a disminuir su actividad por órgano (71 y 68% para los lotes II y III respectivamente, el último día de la experiencia), así como por mg de proteína (44.63 y 62% respectivamente) y por DNA (43 y 78% respectivamente) en los estados carenciales. Ello supone una clara inhibición de la degradación del DNA. Así, los valores de DNA se mantienen a un nivel más alto en los lotes carentes y días señalados de forma paralela al descenso de la actividad DNAsica.

Hemos de recordar que como el contenido de DNA en el núcleo diploide es constante, la determinación química de la concentración de DNA suministra una medida del número de núcleos y por consiguiente, del número de células en un tejido. La medida celular se puede estimar bien por la relación peso/DNA o proteínas/DNA. Esta técnica ha sido aplicada en el crecimiento y nutrición por CAMPBELL y KOSTERLITZ (1949) y por JACOB y col. (1954) y revisada por LEBLOND (1972). Aplicada en tejidos humanos por WATERLOW y WEISZ (1956). Como todos los tejidos y órganos contienen una variedad de células, la medida del número de células y tamaño celular son valores medios del tejido. Además, donde hay células poliploides (Ej.:hígado) el número de células será sobreestimado.

CHEEK y HILL (1970) sugieren que la formación de nuevos núcleos es más sensible a la restricción de energía que a la deposición de proteínas en el músculo. Esta idea en cerebro y bajo las condiciones impuestas no podemos afirmarla tajantemente.

5.6.3.- Variaciones en el RNA total, RNA/DNA, RNA/proteína y actividad RNAsa ácida (tablas 9 y 10)

El contenido de RNA cerebral es proporcional al volumen de los cuerpos celulares (NAKAHARA y col., 1990; SINGH y col., 1990) y depende

además de la cantidad de DNA disponible para su síntesis (MILLWARD y col., 1973; SINGH y col., 1990).

La tasa de síntesis proteica se puede relacionar con el contenido de DNA o de RNA, siendo en este último caso un modelo mas claro. La tasa de síntesis proteica por unidad de RNA es semejante en los diferentes tejidos, a excepción del cerebro, en donde el control de la síntesis es función del contenido de RNA asociado al núcleo celular del tejido (CASPERSSON, 1950). HENCHAW y col. (1971) indican que la síntesis proteica en el cerebro es la mitad que en el músculo. Ello se debe al menor número de ribosomas traductores o a una tasa de elongación más lenta, pero como en el cerebro, según MORTON y col. (1975) la agregación de polisomas es igual a la de otros tejidos, la elongación más lenta debe ser la responsable de la menor síntesis proteica.

A lo largo del proceso experimental, en el lote carente de met+cis (lote II) se detecta un descenso en el contenido de RNA siendo máximo el último día de la experiencia (76.21%) (GRAFICA VII), de acuerdo con MEHTA y col. (1981) y con SINGH y col. (1990). Ello se podría relacionar con la elevación de la actividad RNAsica (por órgano, mg de proteína, RNA y DNA), lo que conduce a un mayor catabolismo del RNA, que influirá de forma negativa sobre la síntesis proteica cerebral.

En el lote carente en met+cis y con la mitad de energía, se observa a lo largo de la experiencia un aumento paradójico en el contenido de RNA respecto al lote II, aunque no hay diferencia significativa con los controles. Ello podría ser debido a que predomina la síntesis de RNA sobre su degradación, aunque la actividad RNAsica es alta (por órgano, mg de proteína, RNA y DNA).

Respecto a la capacidad de síntesis proteica (RNA/mg de proteína) en este lote carente de energía, se observa que aumenta respecto al lote II y se iguala a los controles aunque el contenido proteico disminuya respecto al lote II. Ello indicaría que la falta de energía hace disminuir la síntesis proteica pero no la capacidad de poderla llevar a cabo.

5.6.4.- Efecto sobre las actividades enzimáticas de hidrolasas: Fosfatasa ácida, alcalina y beta-glucuronidasa (tablas 11 y 12)

Algunos autores (TEMLER y col., 1983) han observado en animales modificaciones de la actividad enzimática en tejidos y órganos como consecuencia de la deficiencia o del exceso de aminoácidos esenciales en la dieta. Nosotros- en las tablas 11 y 12- plasmamos las variaciones en la actividad enzimática hidrolásica, tanto por órgano como por mg de proteína, respectivamente, que aparecen como consecuencia de la malnutrición impuesta por la carencia de aminoácidos azufrados en la dieta.

En la gráfica IX, observamos un aumento del 50% en la actividad de la fosfatasa ácida del lote carente en met+cis el día 4 de la experiencia respecto del lote control. Esta elevación en la actividad del enzima, a lo largo de los días va descendiendo, de manera que en el último estadio del proceso (días 8 y 14) no aparecen variaciones significativas, al igual que sucede cuando la expresión la hacemos por mg de proteína. Sin embargo, el lote con la mitad de energía, el día 4 de la experiencia no varía la actividad fosfatasa ácida en el órgano total, mientras que el día 8 sufre una elevación del 55.4% en relación al lote control, y lo mismo sucede cuando la expresión se hace por mg de proteína. Esto podría explicar como la falta de energía provoca una involución en el órgano.

La MPE impuesta, también induce variaciones en la actividad de la fosfatasa alcalina expresada por órgano total. Un 67.40% es la elevación de la actividad del enzima que se produce el día 4 para el lote II, carente en met+cis. Este aumento va descendiendo, de manera que el día 8 se mantiene y el día 14 se llega a igualar el nivel al de los animales control como consecuencia de una adaptación. El lote carente en met+cis y energía mantiene valores no significativos el día 4, mientras que el día 8 sufre un aumento del 67.40%, respecto del control, en la actividad del enzima. Podemos observar que ambos lotes, el día 8 experimental, presentan muy igualados sus valores. La elevación que se produce el día 4 para el lote II está de acuerdo con el punto de vista establecido acerca de un retardo en los procesos del crecimiento que induce este enzima (LUNDGREEN, 1977).

No obstante, por mg de proteína no se observan variaciones significativas, que puede ser debido a una síntesis menor del enzima, mientras que

se produce un ligero aumento el día 8 en ambos lotes carentes respecto al control, probablemente como resultado de una adaptación del enzima al déficit proteico-energético.

Además, es posible que el retardo en el crecimiento sea mediado por un aumento de los glucocorticoides, como consecuencia de una MPE, junto con un descenso de los niveles de insulina plasmáticos como se indicó en la tabla 4.

Aunque la beta-glucuronidasa se ha demostrado que es uno de los enzimas más activos en la involución fisiológica de los tejidos (DE DUVE y col., 1955), en nuestro caso parece que las condiciones malnutricionales en el cerebro sugieren una adaptación de este enzima a la dieta como consecuencia de disponer de suficientes aminoácidos esenciales procedentes de otros órganos (hígado y músculo) para mantener su actividad a niveles apropiados no diferentes a los controles, tanto si se expresa su actividad por órgano como si se hace por mg de proteína.

En resumen, tanto la fosfatasa ácida como la alcalina incrementan su actividad con las dietas carentes, siendo máxima en los lotes II y III para la fosfatasa ácida, mientras que la beta-glucuronidasa no modifica su actividad en este órgano. De igual modo que en hígado y músculo, este aumento de la actividad hidrolásica cerebral, se relaciona con efectos degradativos. Estos resultados, MARCOS (1982) los confirma en hígado y además determina que un déficit proteico conlleva una acción más acusada que la MPE. Este efecto es contrario a nuestros resultados en las fosfatasas ácida y alcalina a nivel cerebral, provocando la falta de energía una actividad superior en ambas enzimas.

5.6.5.- Efecto sobre las actividades enzimáticas de transaminasas: GPT y GOT (tabla 13)

En la tabla 13 se encuentran indicadas las actividades de las enzimas transaminasas, glutámico-piruvato transaminasa (GPT) y glutámico-oxalacético transaminasa (GOT), tanto por órgano como por mg de proteína. En la gráfica X se representa las actividades en UI/órgano.

La actividad GPT por órgano y por mg de proteína no se ve

modificada en los animales control a lo largo del proceso experimental por aumento del crecimiento. Sin embargo, en el lote carente en met+cis, se detecta una elevación (32.4%) el día 4 que se va haciendo menos intensa con el tiempo y así el día 8 aparece un descenso de la actividad del enzima del 34.1% y el día 14, del 50%, respecto a los animales alimentados con caseína. Del mismo modo sucede en el lote carente de aminoácidos azufrados con la mitad de energía, alcanzando descensos significativos en relación a los animales controles del orden del 44.12 y 56.82% los días 4 y 8, respectivamente.

Sólo el último día experimental, el lote carente de met+cis, sufre una disminución del 50% en la actividad GOT expresada por órgano total, el resto de los animales mantienen valores no significativos a lo largo de los días. Cuando la actividad GOT es relacionada con las proteínas del órgano, persiste la invariabilidad de los valores, con excepción del aumento que sufren las ratas del lote III el día 4 de la experiencia.

Considerando que las reacciones de transaminación son parte esencial en los procesos oxidativos de los aminoácidos, se pueden interpretar estos resultados como un mecanismo de protección que lleva a cabo el cerebro con el fin de conservar los AAR sin degradar, para así mantener al máximo los niveles de síntesis proteica cerebral.

5.7.- EFECTO DE LA CARENCIA EN LA DIETA DE MET+CIS Y MET+CIS Y ENERGIA SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y CEREBRO

Los aminoácidos libres, así como las proteínas, pueden caracterizar a un tejido u órgano animal y variar con la edad y el estado nutricional. Por tanto, en este estudio es necesario considerar la relación existente entre la sangre y los tejidos u órganos de interés (PASCAUD y Ng, 1990). Además, en relación con este trabajo, hay que destacar que el cerebro cuenta con una reducida capacidad de síntesis de aminoácidos, en comparación con otros tejidos, por lo que las

concentraciones de aminoácidos que en este órgano existen dependen de sus concentraciones en el plasma (PASSMORE y ESATWOOD, 1986), a excepción de fenilalanina, ácido aspártico y ácido glutámico (GUSTAFSON y col., 1986).

La respuesta fisiológica a la proteína dietaria es función del contenido proteico de la dieta y de la composición relativa de los aminoácidos esenciales y no esenciales de la misma, de tal modo que la modificación selectiva de estos aminoácidos tiene efectos señalados en la concentración de aminoácidos libres en tejidos y en el comportamiento alimentario.

Así, numerosos trabajos, entre los que destaca el llevado a cabo por PETERS y HARPER (1985) en ratas jóvenes en crecimiento, alimentadas con dietas que varían su contenido en caseína entre 5 y 75% y en las que mide el nivel de aminoácidos libres en plasma y cerebro, consideran que dietas bajas en proteínas o en alguno de los aminoácidos afecta en menor grado al contenido de aminoácidos libres del cerebro que al de cualquier otro órgano. Además, el cerebro será más sensible a estas variaciones durante su época de desarrollo (TOTH y LAJTHA, 1980). Pero por ello no hay que dejar de destacar que una privación de proteínas puede hacer descender el nivel de aminoácidos cerebrales y neurotransmisores (BRUNO y col., 1991).

Por otro lado, estudios anteriores (BANAY-SCHWARTZ y col., 1979) confirman que cuando una malnutrición inhibe la síntesis proteica, la degradación de proteínas se ve, de igual modo, reducida, para así preservar las proteínas cerebrales. Una alternativa de este mecanismo de protección, podría ser el transporte activo de aminoácidos al cerebro (OLDENDORF, 1971), lo cual mantendría el nivel de aminoácidos cerebrales en el individuo adulto, pero puede no ser eficaz en el cerebro en desarrollo (SERSHEN y LAJTHA, 1976).

Al mismo tiempo, la concentración de aminoácidos en sangre responde a cambios en la ingesta proteica. Numerosos estudios han demostrado que dietas con diferente contenido proteico inducen alteraciones en los patrones de aminoácidos en plasma y cerebro (PENG y col., 1972; FERNSTRON y col., 1978; GLAESER y col., 1983; CROWELL y col., 1990; PASCAUD y Ng, 1990) admitiéndose que muchas de las respuestas fisiológicas producidas se pueden predecir como funciones de un nutriente dietario limitante.

Hay que comentar al respecto la influencia que ejerce el nivel de aminoácidos sobre la concentración de hormonas séricas, modulando la secreción de insulina (FLOID y col., 1966; MAZZAFERRI y col., 1983), glucagón (ROCHA y col., 1972; ASSAN y col., 1981) y hormona de crecimiento (KNOPF y col., 1965).

Es interesante considerar, en este sentido, el papel de la insulina sobre los aminoácidos plasmáticos. Ya ADIBI y col. (1973) señalan que en estado postabsortivo, el nivel de los aminoácidos plasmáticos refleja el balance entre la liberación por el músculo esquelético y la captura por el hígado. Un estado de hiperinsulinemia obstaculiza la salida de aminoácidos del músculo, al tiempo que favorece su transporte al interior de las células en favor de la síntesis proteica, de manera que disminuyen los valores de aminoácidos plasmáticos (AAR, fenilalanina, tirosina, treonina, serina y prolina), siendo los AAR (leucina, isoleucina y valina) junto con la glucosa, las sustancias más sensibles a la acción de la hormona (FUKAGAWA y col., 1986; BEYLOT y col., 1989).

La participación de los eritrocitos en el transporte de aminoácidos por el sistema circulatorio ha sido objeto de controversia durante mucho tiempo y aún permanece sin aclarar, aunque se está trabajando sobre el tema (CHRISTENSEN, 1982).

En principio se aceptó que los eritrocitos no contribúan al metabolismo tisular de los aminoácidos y por ello la mayoría de los datos disponibles hasta hace poco tiempo han sido obtenidos mediante la utilización de plasma, en vez de la sangre total. Sin embargo, trabajos realizados en animales y en hombre han demostrado que las células rojas de la sangre pueden estar implicadas en el transporte de aminoácidos.

Los intercambios de aminoácidos entre plasma y tejidos y entre glóbulos rojos y células tisulares, son rápidos e independientes el uno del otro. Por el contrario, el intercambio entre plasma y glóbulos rojos es muy lento. Ello permite al plasma y a los eritrocitos jugar papeles independientes y frecuentemente opuestos en el transporte de aminoácidos entre órganos (DARMAUN y col., 1989). También se considera que los glóbulos rojos son capaces de intercambiar los aminoácidos directamente con las células tisulares y las fracciones de aminoácidos libres tisulares que intercambian con los glóbulos rojos son distintas a las fracciones de

aminoácidos que intercambian con el plasma. Se acepta que en los tejidos existen distintos tipos de células, unas intercambian los aminoácidos con los eritrocitos directamente y otras tienen un intercambio mayor o menor con el plasma (ELWIN y col., 1972).

El transporte de aminoácidos de la sangre al cerebro es un proceso saturable que incluye diferentes sistemas de transporte para los aminoácidos neutros, básicos y ácidos, los cuales compiten entre sí por la unión a su transportador específico, como ya se ha mencionado en este trabajo.

El transporte de estos aminoácidos a través de la BHE se modifica por la composición de aminoácidos en sangre. Los bajos valores de la K_m para este transporte indican la gran sensibilidad a los cambios en las concentraciones plasmáticas de estos aminoácidos (TEWS y col., 1988) como indican las medidas del transporte de valina o treonina radiactivos después de alterar el patrón aminoacídico de la sangre (TEWS y col., 1987 a,b). Si bien por este motivo no tiene porqué haber una relación directa entre las concentraciones plasmáticas y cerebrales de aminoácidos.

La anestesia es otro factor que puede modificar la entrada de aminoácidos al cerebro. El flujo de aminoácidos, generalmente, es bajo en ratas anestesiadas con barbitúricos, probablemente porque este tipo de anestésicos puede deprimir la concentración de aminoácidos plasmáticos (TEWS y col., 1987b).

5.7.1.- Aminoácidos de cadena ramificada (tablas 14, 25 Y 35)

El hígado, es el órgano con mayor capacidad de aclaramiento plasmático para la mayoría de los aminoácidos, excepto para los de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), que son metabolizados principalmente en el músculo (de un 30 a un 70% de los AAR), según estudios realizados, mediante infusión de una mezcla de aminoácidos en ausencia de otros nutrientes, por GELFAND y col. (1986).

La concentración de los AAR en plasma, glóbulos rojos y tejidos, responde a cambios en los estados nutricionales y metabólicos (PENG y col., 1972; TEWS y col., 1980; DARMAUN y col., 1989).

La carencia de met+cis y met+cis y la mitad de energía provocan un descenso significativo respecto a los controles en los valores de AAR considerados individualmente y como suma total de los mismos en el plasma (de acuerdo con SOEMITRO y col., 1989) del orden de 43, 10 y 44% para los días 4, 8 y 14, respectivamente (tabla 14, GRAFICA XI). Dicho descenso en los niveles de AAR plasmáticos, viene motivado en segundo lugar por la disminución en los lotes II y III de la ingesta (del orden del 50%), en concordancia con las observaciones de YOUNG y HILL (1981) y en último término por la captación muscular (RAO, 1974). Además, YOUNG y HILL estudiando un grupo de enfermos malnutridos después de una cirugía abdominal, encuentran que los valores plasmáticos de AAR se correlacionaban con la pérdida de peso corporal, lo que apoya los resultados de este experimento. En este sentido, se ha comprobado que un pequeño exceso en la dieta de valina e isoleucina, alivian la disminución de la ingesta y del crecimiento (CROWELL y col., 1990; KEVIN y col., 1991).

Se debe destacar que el día 8 aparece una elevación de las concentraciones de AAR plasmáticos respecto a los días cuarto y octavo. Ello coincide con los estudios de WIDHALM y col. (1989) en obesos sometidos a una dieta baja en calorías, indicando un estado catabólico elevado, con aumento del flujo aminoacídico desde el músculo y disminución del aclaramiento plasmático en el hígado (FURST y col., 1982).

Si el día 4 los niveles de insulina plasmática (tabla 4) aparecen normales, ya los días 8 y 14 se detecta un descenso de la hormona.

Dicha situación se ve correlacionada con los niveles de AAR plasmáticos cada día. Y es que la insulina favorece la entrada de aminoácidos a las células, lo que hace disminuir los aminoácidos plasmáticos (especialmente los AAR) y la glucosa. En nuestro caso, el descenso de insulina hace que se produzca liberación de glucagón, que induce la captura y utilización de los aminoácidos por el hígado, promoviendo la gluconeogénesis y la proteólisis e inhibiendo la síntesis proteica (BEYLOT y col., 1989).

Sin embargo, dado que los AAR son los aminoácidos más sensibles a pequeñas variaciones de insulina (BEYLOT y col., 1989) (la alanina es el menos sensible, FUKAGAWA y col., 1985) y a que nos encontramos ante una deficiencia

aminoacídica, con el paso del tiempo, dicha carencia se hace notar (días 8 y 14 experimentales) y, de acuerdo con JEPSON y col. (1988), se produce una drástica reducción de la síntesis proteica y un estado catabólico, especialmente detectable en la proteína muscular. Este estado se ve, así mismo, favorecido por la situación de stress generada en los animales y que determina la liberación de glucocorticoides de conocido efecto catabólico sobre las proteínas musculares de rata. En este sentido, se sabe que estas hormonas producen un aumento en la actividad de los enzimas implicados en la autólisis de las proteínas miofibrilares (MAYER y col., 1976), además de inducir una marcada hiperglucemia e hiperinsulinemia (LUNN y col., 1976). Ello se relaciona con el mantenimiento de los niveles de glucosa respecto al que presenta el lote control (tabla 4) y con el significativo descenso en la concentración plasmática de alanina, principal aminoácido gluconeogénico en el hígado, tal como se revisará más adelante.

De forma similar al plasma, sucede en los AAR de los eritrocitos a lo largo del tiempo experimental en este trabajo (tabla 25, GRAFICA XI). Aparece el día 8 con niveles más altos de AAR respecto al día 4, en ambos lotes carentes, siendo la concentración más alta en el lote III.

Se puede observar de forma global a lo largo de los 14 días del suministro de estas dietas una disminución de isoleucina y valina por efecto de la dieta II y un aumento de isoleucina, leucina y valina por efecto de la dieta baja en energía. Esto mismo sucede con la suma total de AAR de los lotes II y III con respecto a la dieta control.

Sóloamente la tasa de valina y los AAR como suma total disminuyen por igual por efecto de ambas dietas carentes en el lote II. Al octavo día únicamente la dieta carente en met+cis y energía induce un incremento de la tasa de isoleucina, leucina y valina, así como su suma. Al decimocuarto día los animales sometidos a la dieta II (carente en met+cis) disminuyen su nivel de isoleucina, valina y AAR totales, manteniendo el nivel de leucina.

En cualquier caso, la imposibilidad de llevar a cabo la síntesis proteica en nuestros animales, determina la necesidad de conducir a los AAR hacia otros destinos metabólicos. Así, el esqueleto carbonado de la valina, degradado a succinil-CoA tendrá propiedades glucogénicas, mientras los productos del

catabolismo de la leucina, acetoacetato y acetil-CoA, precursores potenciales del colesterol y ácidos grasos, serán desviados hacia la producción de grasa para el metabolismo energético. La isoleucina, que produce acetil-CoA y succinil-CoA compartirá ambos destinos (TANAKA y col., 1988).

Sin embargo, la inhibición de la síntesis proteica generalizada en órganos y tejidos, no parece producirse en forma drástica en el tejido cerebral. Si se estudia el efecto de las dietas carentes sobre los niveles cerebrales de los AAR (tabla 35, GRAFICA XI) se observa que ambas dietas no afectan a los mismos, a excepción del aminoácido isoleucina, que aumenta en igual proporción en ambas dietas. Así, se encuentra una elevación al cuarto día experimental en isoleucina, leucina, valina y suma total (AAR), especialmente con la dieta III baja en energía. Ello podría deberse a un mayor transporte de aminoácidos y/o sus correspondientes alfa-cetoácidos al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, con la consiguiente aminación de los alfa-cetoácidos por la aminotransferasa cerebral.

Este día sus valores en plasma no son altos pero como este mismo día los valores plasmáticos de sus competidores, tirosina, fenilalanina y triptófano, también son muy bajos respecto del control, podría darse la situación de su mayor transporte al cerebro (idea apoyada en las observaciones de CROWELL y col., 1990).

Al octavo día, sólo la isoleucina aumenta con la dieta baja en energía y ya al decimocuarto día, las concentraciones cerebrales de éstos aminoácidos no se modifican.

Concluyendo, el cerebro parece no recibir señales durante los 14 días experimentales en forma de cambios en los niveles de AAR que puedan utilizarse para determinar el nivel de proteína y/o energía que está siendo consumida, siendo la isoleucina la excepción en este experimento. Esta idea puede coincidir con las observaciones de TOTH y LAJTHA (1980), quienes comparan experiencias en monos y ratones. Los niveles altos que se producen de isoleucina podrían ser consecuencia de la competición que se establece entre los aminoácidos neutros (tirosina, triptófano, fenilalanina, valina, isoleucina y leucina) al atravesar la barrera hematoencefálica, de manera que hay aumento del transporte de isoleucina a expensas de los niveles plasmáticos y eritrocitarios que disminuyen.

5.7.2.- Aminoácidos gluconeogénicos (tablas 15a, 15b, 26a, 26b, 36a, 36b)

El hígado ocupa una posición central en la homeostasia de los hidratos de carbono por la captación y liberación de glucosa al torrente sanguíneo.

La glucosa captada por el hígado se utiliza para la síntesis de glucógeno, formación de triglicéridos y glucolisis. En estado de ayuno, el hígado produce y libera glucosa por gluconeogénesis y glucógenolisis. Cuando los almacenes de glucógeno son agotados por el ayuno, el hígado continúa liberando glucosa mediante gluconeogénesis utilizando los aminoácidos gluconeogénicos (aspártico, glutámico, asparragina, serina, glutamina, glicina, treonina y alanina), principalmente alanina y glutamina, liberados por el músculo. El control está a cargo de la insulina y el glucagón. La insulina incrementa la síntesis de glucógeno y reduce la glucolisis y glucogénesis. Dichas hormonas ejercen efectos opuestos sobre la captura y liberación de glucosa por el hígado, de manera que la relación glucagón/insulina aumenta durante el ayuno, la diabetes, etc.

Según AYUSO y col. (1986), parece haber una relación inversa entre la síntesis proteica hepática y el flujo de gluconeogénesis. Una síntesis proteica disminuída ahorra energía y aminoácidos que pueden ser convertidos en glucosa.

En las gráficas XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII y XIX, se puede ver la evolución de los aminoácidos gluconeogénicos en plasma, eritrocitos y tejido cerebral.

Acido aspártico y asparragina

Según aparece en la tabla 15a, el nivel del ácido aspártico del plasma no parece ser muy afectado por efecto de las dietas carentes. Aún así, sí es detectable una mayor influencia por la restricción energética que por la carencia aminoacídica, apreciable el día 8 en los animales del lote III, los cuales acusan una disminución de ácido aspártico plasmático en relación a los animales control ese mismo día.

Estas escasas variaciones del ácido a nivel plasmático también son

encontradas por SEMON y col. (1989) al modificar el contenido de caseína de la dieta.

Pero independientemente de los niveles de ácido aspártico en el plasma, órganos como el hígado y el músculo llevan a cabo una tarea rápida de aclaramiento sanguíneo de este aminoácido oxidándolo preferentemente a dióxido de carbono. De este modo el organismo se protege de la potencial neurotoxicidad del ácido aspártico (KADOWAKI y col., 1984).

Por lo que respecta a los glóbulos rojos sanguíneos (tabla 26a), las diferencias en las concentraciones del aminoácido entre el lote de animales alimentados con dieta de caseína y los alimentados con dietas carentes, se hacen más apreciables que en plasma y tejido cerebral. Así, en el lote II se observa el día 4 un nivel de ácido ligeramente superior al control (28%), que a lo largo del tiempo va descendiendo hasta hacerse significativamente más bajo. Ello, sumado al aumento que experimenta el lote alimentado con caseína, eleva la diferencia entre ambos grupos de animales hasta un 61 % el último día experimental (día 14). Sin embargo, una evolución inversa a lo largo del tiempo experimental y con relación a estos animales alimentados con dietas carentes en met+cis (lote II), es la que se observa en los animales deficientes de energía. En ellos no se pasa de un nivel de aminoácido alto el día 4 a bajo el día 14, respecto al control, como sucede en el lote II, sino que estas ratas pasan de tener un valor reducido de ácido aspártico el día 4 (23 y 40% respecto a los lotes I y II) a tener el día 8 un valor significativamente más alto que el control.

Una vez más, se puede apreciar la lucha del organismo por proteger su parte más esencial, el cerebro. No se observan en este tejido efectos especiales de las carencias dietarias sobre el nivel de ácido aspártico (tabla 36a), tan sólo el día 4 del experimento, en el lote III deficitario de energía, se aprecia un aumento (48%) respecto al lote control, no haciéndose significativo en relación al lote II.

La asparagina plasmática (tabla 15a) presenta descensos significativos a lo largo del proceso experimental por efecto de las dietas carentes, de acuerdo con ADIBI y col. (1973) que trabajaron con ratas alimentadas con dietas sin proteína. La falta de energía en el lote III hace que la tasa del aminoácido se vea más afectada en su descenso que en el caso de la dieta carente en met+cis. Así,

se calculan disminuciones respecto a los animales utilizados como control y alimentados con dietas caseinadas del orden de 41, 30 y 21% y de 60 y 48% para los lotes II y III, los días 4, 8 y 14, respectivamente.

Se puede apreciar como a medida que transcurre el tiempo experimental los animales tienden a igualar la tasa del aminoácido al de los controles, pese a que no lo llegan a conseguir durante el periodo estudiado.

Descensos similares se hacen patentes en los glóbulos rojos (tabla 26a) del lote II. Sin embargo, en el lote III, frente al descenso significativo que se detecta el día 4 experimental (del 59 y 24% en relación al lote control y al lote II respectivamente), aparece el día 8 una elevación inesperada en el valor del aminoácido del orden del 56% respecto al lote control y del 98% respecto al lote II.

Pero de igual modo que sucede con el ácido aspártico, el aminoácido asparragina a nivel cerebral (tabla 36a) no se deja influir por sus valores en plasma y eritrocitos, no detectándose diferencias significativas a este nivel. Tan sólo esta invariabilidad se ve interrumpida el día 8 en el lote III con un ligerísimo descenso respecto al lote control, pero no si es comparado con el lote II.

Acido glutámico y glutamina

En los últimos 30 años se ha estudiado y visto que el ácido glutámico, junto con el aspártico (ambos aminoácidos de carácter ácido) no sólo están involucrados en reacciones metabólicas, sino que también contribuyen al control funcional del sistema nervioso central de mamíferos como neurotransmisores excitatorios (SANDBERG y col., 1987).

Por otro lado, es bien sabido, que la concentración intracelular de glutamato y aspartato en el sistema nervioso central es mucho más alta que en el medio externo. Ello ocurre gracias a un sistema de transporte activo que requiere iones sodio y energía (sin intervención del ATP) y se rige por la cinética de Michaelis- Menten. Este sistema de transporte, localizado en la membrana plasmática, también se encarga de transportar cistato, cisteína-sulfitato etc, no siendo válido para los aminoácidos neutros y el GABA (ERECINSKA, 1987).

En este trabajo se determinan las concentraciones de ácido glutámico libre en plasma, glóbulos rojos y tejido cerebral, a fin de establecer las diferencias en cada compartimento.

Así, ha resultado, que este aminoácido en plasma (tabla 15a) sufre un progresivo aumento a lo largo del periodo experimental en los animales control, alimentados con caseína, que se hace evidente el último día de la experiencia (día 14). Este aumento se ve también reflejado en los animales que componen el lote II alimentados con dietas carentes en met+cis, de manera que el día 14 aparece una concentración superior en un 436% a la que presentan estos animales el día 4, y un 118% mayor que la del lote control el día 14. Este mismo patrón se presenta en glóbulos rojos (tabla 26a) con aumentos del 67 y 98%, respecto al lote control, los días 8 y 14, respectivamente. De igual modo ocurre con los animales del lote III.

La evolución de los niveles de ácido glutámico podría verse relacionada con la modificación de la concentración de insulina en el plasma ya que, según afirma AOKI y col. (1972), la insulina ejerce un efecto positivo sobre la captación de glutámico por el músculo de manera que al disminuir los niveles de la hormona en plasma (tabla 4), se ve favorecido el flujo del aminoácido hacia el plasma y los eritrocitos. Los glóbulos rojos de la sangre parecen así jugar un papel dinámico, más que meramente estático, en el transporte de aminoácidos, viéndose implicados, tal como se deduce de la rápida entrada y salida de estos en las células sanguíneas, un proceso activo con requerimiento de energía, más que un simple transporte por difusión.

Así mismo, AOKI y col. (1972) proponen que la insulina de alguna manera sensibiliza la membrana de las células sanguíneas, de modo que cuando estas atraviesan zonas musculares de activa síntesis proteica, con requerimiento de aminoácidos, son incapaces de mantener el gradiente, liberando como consecuencia, aminoácidos al plasma y al músculo. Una segunda posibilidad sería la inactivación, por la insulina, de un "segundo mensajero" a nivel muscular que favorezca la liberación de aminoácidos desde los eritrocitos de la sangre. En cualquier caso, se evidencia el papel de los glóbulos rojos transportando aminoácidos desde regiones corporales de mayor concentración hacia otras en que existe menor concentración o mayor demanda.

Las ratas del lote control presentan a nivel cerebral (tabla 36a) gran estabilidad en la tasa de ácido glutámico a lo largo del proceso experimental. Al final de este periodo (días 8 y 14), los animales del lote II, posiblemente por adaptación, consiguen valores del aminoácido semejantes a los del control, pese a haber sufrido una ligerísima disminución (22.6%) el día 4 del experimento. Esta estabilidad final en la tasa de ácido glutámico en el tejido cerebral, probablemente sea consecuencia del descenso que se produce a nivel muscular, y del aumento en el plasma y glóbulos rojos. Además, la estabilidad de los valores de aspartato a niveles normales, no causa problemas en el transporte competitivo que se establece entre ambos neurotransmisores.

La deficiencia energética inducida en los animales del lote III también carentes de met+cis, podría ser el primer y más importante motivo de que el ácido aspártico sea empleado, en gran parte, en la gluconeogénesis. De este modo es posible justificar el descenso considerable que sucede en los niveles del aminoácido tanto en el plasma (51 y 43% en relación al control los días 4 y 8, respectivamente) como en el tejido cerebral (37.8 y 37.2% en relación al control los días 4 y 8, respectivamente), si bien es cierto que no hay variaciones significativas en los eritrocitos. En este último compartimento, aunque la tasa de glutamato se eleva en el tiempo, no llega a alcanzar los valores que el lote II.

Mucho se sabe sobre el importante papel que juega la glutamina en el metabolismo y fisiología celular siendo el principal constituyente de la dieta y de las proteínas y péptidos endógenos. Sin embargo, su papel exacto en el turnover proteico y en el metabolismo nitrogenado, resulta, en parte, desconocido (CERSOSIMO y col., 1986; SOUBA, 1991).

La glutamina, es uno de los aminoácidos más abundantes en el organismo. Se encuentra en el plasma en mayor proporción que otros aminoácidos y constituye más del 50% del contenido aminoacídico intracelular (AOKI y col., 1981; ABUMRAD y MILLER, 1983; ELIA y col., 1988).

En numerosas especies animales se ha comprobado que, bajo condiciones normales y de acidosis, el intestino delgado (BERGMAN y HEITMAN, 1978) y los riñones (OWEN y ROBINSON, 1963; SOUBA, 1991) son los lugares más importantes para la utilización de esta amina, mientras que su

producción, bajo condiciones normales o patológicas, se lleva a cabo principalmente en el músculo esquelético (ABUMRAD y col., 1982; ELIA y col., 1988; SOUBA, 1991) a partir de ácido glutámico y amoníaco y con intervención de la glutamina sintetasa. Diferentes situaciones catabólicas harán aumentar su consumo (SOUBA y col., 1985; SOUBA, 1991), lo que hace pensar en el importante papel que desempeña en la economía del nitrógeno, como ahorrador de este.

CERSOSIMO y col. (1986) observan que durante el ayuno no se produce un cambio significativo de la glutamina sanguínea, debido al suministro llevado a cabo por tejidos extrarrenales (y no sólo por el músculo esquelético) que compensa la alta captura del aminoácido por los riñones.

Además, el metabolismo intestinal de la glutamina proporciona precursores y productos finales nitrogenados para la gluconeogénesis y la síntesis de urea en el hígado (WINDMUELLER, 1982; SOUBA, 1991).

Por tanto, durante el ayuno o la malnutrición se producen una serie de cambios adaptativos en el metabolismo de la glutamina, alanina, amoníaco y urea que resaltan el importante papel de la glutamina en la regulación de sustratos y en el metabolismo energético. Se destaca además su importancia como anticetogénico y antilipolítico.

La falta de metionina y cistina en la dieta II, así como la restricción energética en la III, inducen descensos de glutamina en plasma (tabla 15a) respecto a la dieta control los días 4, 8 y 14 de la experiencia del orden de 35, 50 y 65% y del 55 y 58%, respectivamente. Observándose, claramente, un descenso, a lo largo del tiempo, en cada lote, que se hace más apreciable en el lote II (43% el día 14 respecto al 4). Se puede suponer que este descenso es debido a la participación que tiene la glutamina en la gluconeogénesis, más apreciable en el lote III, basándonos en los estudios de PADRO y col. (1984).

En el compartimento eritrocitario (tabla 26a) aparecen valores de glutamina significativamente superiores al control el día 4 de la experiencia para ambos lotes carentes. Estos valores descienden a lo largo del proceso, resultando para el lote II los días 8 y 14 con una diferencia significativa del 39 y 32.66%, respectivamente. El lote III no hace descender el valor del día 4, pero se iguala al

control el día 8 debido a que este presenta una tendencia considerable a aumentar en el tiempo.

El descenso de glutamina en plasma y glóbulos rojos coincide con el trabajo de ELIA y col. (1988) y pudiera estar relacionado con un aumento de la demanda de este aminoácido por tejidos como intestino y riñón, que tiene lugar en estados catabólicos como el ayuno y que, CERSOSIMO y col. (1986) relacionan con un aumento de la amoniogénesis en estos tejidos lo que hace aumentar las pérdidas de nitrógeno debidas a la glutamina en detrimento de la alanina. Paralelamente, aumenta la captación de amoniaco por el músculo esquelético, como se ha podido comprobar también en este trabajo, favoreciendo así la síntesis de glutamina frente a la de alanina. Y por último formando parte de toda esta serie de cambios adaptativos según CERSOSIMO y col., es posible que el hígado aumente la producción de glutamina en lugares perivenosos a partir del amoniaco portal exógeno, mientras que el amoniaco endógeno, procedente de alanina y/o glutamina hepática, pasa a sangre portal produciendo urea en lugares periportales.

Por otro lado, hay que considerar que la glutamina es sustrato de la gluconeogénesis, directamente y a través de su transformación en alanina a nivel del enterocito (MUNRO, 1970).

Finalmente, el organismo refleja un afán protector para el cerebro, mostrando una tendencia a mantener estables los niveles aminoacídicos, en este caso, de glutamina. En la tabla 36a se contrasta la tasa de este aminoácido para los diferentes lotes de animales a lo largo de los 14 días que dura el experimento. Se puede observar que pese a la invariabilidad que muestra el lote II en sus valores, comparados con los del control, hay una ligerísima tendencia al aumento desde el día 4 hasta el 14. Lo contrario sucede en el lote III, el cual, el día 8 consigue superarse al nivel presentado por el control en un 164.29%, lo que podría explicar el papel excitatorio de la glutamina en el comportamiento de los animales.

Serina, glicina y treonina

Serina, glicina y treonina son aminoácidos que se encuentran entre los mas sensibles a la falta de metionina y cistefna en la dieta, con significativos aumentos, especialmente en el caso del lote II, en los tejidos considerados (véanse

las tablas 15b, 26b, 36b).

La carencia aminoacídica (met+cis) impuesta a los animales del lote II hace que los valores de serina en plasma, eritrocitos y tejido cerebral tiendan a aumentar respecto a los animales alimentados con caseína, con unas variaciones significativas el día 14 del orden de 579.19, 692.05 y 330.11%, en cada compartimento respectivamente. Estos resultados confirman la activa participación de la serina en las modificaciones de los niveles de aminoácidos libres en los diferentes tejidos.

La restricción energética junto con la carencia de met+cis impuesta en el lote III de animales conduce hacia un equilibrio de los valores de serina al final del periodo experimental en relación al control. De este modo, en plasma se observa ya desde el día 4 un descenso del aminoácido con relación al lote II, consiguiendo igualarse al control y esta situación se mantiene hasta el día 8. Aunque el día 4 en glóbulos rojos el lote III de ratas no presenta diferencia significativa con el control, aparece el día 8 una elevación del 140% disminuyendo la diferencia con el lote II a un 66%. A nivel cerebral en estos animales sucede lo contrario que en eritrocitos, detectándose respecto al lote I un aumento (31.4%) de la concentración de serina el primer día del experimento (día 4) y un valor no significativo el último día (día 14).

SOEMITRO y col. (1989), al observar la concentración de serina en plasma, afirma que esta es directamente proporcional al contenido proteico de la dieta dentro del rango 0-20% de caseína, alcanzando posteriormente una meseta. Por otro lado, ven que la concentración de glicina en plasma con distintos niveles de caseína en la dieta es inversamente proporcional al contenido proteico de la misma.

El mantenimiento de los valores de glicina cerebral que se produce en los animales de experimentación (lotes II y III) comparados con los controles, no se observa a nivel sanguíneo. De manera, que la carencia de metionina y cisteína en la dieta administrada a los animales del lote II hace aumentar en plasma esos valores (270, 268 y 172%, los días 4, 8 y 14 del experimento, respectivamente), de acuerdo con ADIBI y col. (1973) que trabajan con humanos alimentados con dietas isocalóricas libres de proteíñas.

Lo mismo sucede en el lote III aunque la restricción energética conduce a un aumento más discreto (91.79 y 62.91% los días 4 y 8 respectivamente). De igual modo se produce una elevación muy significativa de la glicina eritrocitaria los días 4, 8 y 14 para ambos lotes experimentales. Así, en estos días se encuentran para el lote II aumentos del 175.13, 192.94 y 90.14% y para el lote III, 43.16 y 120.56%.

Tal como afirman DARMAUN y col. (1989), sólo una fracción de la glicina inmersa en los glóbulos rojos es intercambiable con el plasma, pudiendo ser el glutatión, un tripéptido rico en glicina de elevada concentración en glóbulos rojos, la fuente principal del aminoácido en los eritrocitos.

Probablemente la estabilidad del nivel de glicina cerebral dentro de intervalos normales sea a costa de las variaciones producidas en la treonina. Se comprueba en este estudio que lo mismo que le ocurría a TEWS y col. (1987b), al haber reducido la proteína dietaria, aumenta el contenido de treonina cerebral. Ello se ve reflejado en el lote alimentado con un 10% de caseína, a medida que transcurren los días el nivel de treonina se hace más alto en cerebro. TEWS y col., comprueban estos mismos efectos en plasma con ratas alimentadas con un 6, 18 y 50% de caseína.

La treonina, junto con la lisina son aminoácidos limitantes en la dieta, por encontrarse en esta en pequeña cantidad, aunque los requerimientos son bajos (CIESLAK y BENEVENGA, 1986). Posiblemente la treonina, al igual que la metionina atraviesan la barrera hematoencefálica mediante el mismo sistema de transporte que los AAN de cadena larga (MERCER y col., 1989).

En este trabajo, también se puede observar en el tejido cerebral como la concentración de treonina va en aumento a medida que pasa el tiempo cuando a los animales se les priva de metionina y cisteína (lote II). Así, pese a que el día 4 no se halla diferencia significativa con el control, los días 8 y 14 sucesivos se producen unas elevaciones del 221.82 y 475.65%, respectivamente, haciendo la comparación con el lote I. Algo muy diferente sucede por efecto de una restricción energética (lote III), el primer día experimental se calcula una diferencia significativa con el control de 73.74% aunque el valor se considera igualado al del lote II. Esta diferencia con los animales del lote control, va decreciendo, de forma que el

día 8 ha desaparecido pero, sin embargo, por la elevación del aminoácido que va surgiendo en el lote II a lo largo del periodo experimental, se puede calcular en este segundo día del trabajo una disminución del 56% respecto a este lote II de animales.

Fácilmente se aprecia en las tablas correspondientes (15b y 26b) el espectacular crecimiento de la tasa del aminoácido en las ratas del lote II respecto a aquellas alimentadas con caseína y a lo largo del tiempo experimental, tanto en plasma como en eritrocitos (lo mismo que sucede en el tejido cerebral).

En el compartimento plasmático, la treonina se eleva un 133% entre el primero y último día de la experiencia, permaneciendo, como hemos dicho ya, por encima de los animales alimentados con caseína (145, 631 y 315 % los días 4, 8 y 14, respectivamente). Del mismo modo sucede en las células rojas de la sangre (120, 386 y 265% respecto al lote I los días 4, 8 y 14).

Es evidente que las necesidades gluconeogénicas del organismo conducen a elevaciones menos marcadas de los niveles de treonina cuando se trata de las ratas alimentadas con dietas carentes de metionina y cisteína y con restricción energética (lote III).

Así, estos animales mantienen en plasma un valor del aminoácido igualado al de los controles y por debajo del presentado por el lote II. Del mismo modo sucede en los eritrocitos el día 4, aunque el día 8 se produce un aumento del 17% respecto al lote I.

Podemos concluir, que las elevaciones de glicina, serina y treonina plasmáticas que se producen en este trabajo y bajo las condiciones experimentales impuestas, coinciden con los resultados de WIDHALM y col. (1989) trabajando

con individuos sometidos a restricción calórica. Achacan estos efectos a un aumento de la liberación periférica de estos aminoácidos en condiciones de ayuno.

En las condiciones experimentales del presente estudio, una posible explicación a la gran acumulación de los aminoácidos que se están comentando, reside en el bloqueo de la ruta metabólica en la que la serina da lugar a la

formación de cistationina, por acción de la enzima cistationín sintetasa, según la reacción:



La falta de homocisteína, de la que metionina y cisteína son precursores, impedirá la utilización de la serina en esta reacción, favoreciendo su acumulación (LEHNINGER, 1972).

Dado que la serina es precursor de la glicina y este se relaciona con la treonina, el aumento de los niveles del primero justifica la elevación de la concentración de los restantes aminoácidos.

Además, tal como afirman TANAKA y col., (1984, 1987), el esqueleto carbonado de la serina y glicina se utiliza de modo preferente en la síntesis proteica, más que para la producción de energía. Dado que la síntesis de proteínas se ve impedida por la falta de metionina, se favorece entonces la acumulación de estos aminoácidos.

La treonina, lo mismo que la lisina, aunque se libera en la proteólisis muscular y se encuentra en altas concentraciones en sangre, estas se mantienen en su tasa normal gracias a que la actividad oxidativa de las enzimas degradadoras es muy baja o se encuentra en baja concentración en un estado de MPE.

Alanina

La alanina es considerada el principal aminoácido precursor de la gluconeogénesis en el hígado (FELIG y col., 1970).

A través del ciclo glucosa-alanina, se produce glucosa que es distribuida por la sangre a los diferentes órganos, entre ellos el cerebro, para mantener su nivel dentro de intervalos normales.

El músculo juega un importante papel en la producción de alanina a partir de aminoácidos y del piruvato que proviene de la oxidación de la glucosa. Esta alanina es utilizada por el hígado para formar glucosa.

Incluso durante el ayuno, el músculo esquelético capta glucosa para liberarla como alanina en plasma. Para ello, la fuente de nitrógeno, no sólo es el catabolismo proteico muscular, sino también la leucina captada por el músculo desde la sangre (incluso en situación de ayuno) siendo el proceso muy sensible al estado nutricional. Cuando aumenta la leucina en sangre, aparece más alanina y glutamina. Además, en dicha situación, decrece la oxidación de glucosa en el músculo porque se inhibe la oxidación de piruvato.

En el estudio presente, la administración de dietas carentes en metionina y cisteína con o sin restricción energética conduce, como se ha podido comprobar, a una disminución de la concentración muscular de alanina, estando la glucosa plasmática a nivel normal y la insulina disminuída como ya se ha comentado y de acuerdo con FUKAGAWA y col. (1985). Ello se atribuye a que la síntesis "de novo" de este aminoácido, se ve reducida en situaciones de deficiencia proteica (TAWA, 1984) así como en estados de ayuno (CERSOSIMO y col., 1986), viéndose favorecida en este caso la síntesis de glutamina.

A nivel plasmático (tabla 15b), la alanina procedente del músculo logra mantener los valores normales en el lote carente en metionina y cisteína (lote II), pero cuando la agresión a la que se les somete a los animales es mayor- caso del lote III con restricción energética- los valores de alanina llegan a descender significativamente (68 y 57% respecto a los lotes I y II el día 4; y 67 y 72% el día 8). WIDHALM y col. (1989) interpretan el mantenimiento de la hipoalaninemia, en situación de aporte calórico restringido, como un intento de minimizar la conversión proteica en hidratos de carbono en un efecto ahorrador de proteína, aunque PADRO y col. (1984) lo atribuyen al elevado porcentaje de aclaramiento de alanina hepática ya que es un sustrato esencial en la gluconeogénesis. En este sentido, SOEMITRO y col. (1989), al observar la concentración de alanina en plasma afirma que esta es directamente proporcional al contenido proteico de la dieta dentro del rango 0-20% de caseína, alcanzando posteriormente una meseta.

Por otro lado y según afirman FELIG y col. (1973), los eritrocitos (tabla 26b) por su parte son responsables de un 22-32% del movimiento de entrada o salida de alanina en la sangre en cada uno de los tejidos examinados, desempeñando un papel fundamental en la captación del aminoácido a nivel esplácnico, no así en el caso de la glutamina.

En los animales tratados en este trabajo se detectan valores de alanina eritrocitaria sin significación al final del periodo experimental, aunque al principio de este tiempo, día 4, se producen descensos respecto a los animales control del 27 y 40% para los lotes II y III, respectivamente.

Por último, cabe destacar que toda esta trama de procesos metabólicos hace que en el tejido cerebral (tabla 36b) los valores de alanina permanezcan dentro de los límites normales con la única excepción de un descenso ligero en el lote II el día 8, que supone un 27% frente al lote control.

La tasa de alanina (MATSUMOTO y col., 1985) debe permanecer dentro de la normalidad ya que es de crucial importancia para el comportamiento de los animales dado que, junto con el ácido gamma-amino-butírico, glicina y taurina, actúa como transmisor inhibitorio, lo que contrarresta en parte, sin poder superar, la excitación observada en los animales por efecto del glutamato y aspartato, principalmente (SANDBERG y col., 1987).

5.7.3.- Aminoácidos aromáticos (tablas 16,17,21,22,27,28,31,32,37,38)

Las modificaciones experimentales en las concentraciones sanguíneas de aminoácidos, produce cambios concomitantes en los niveles cerebrales de tirosina y/o triptófano que harán variar la síntesis de catecolaminas y/o serotonina, respectivamente (THURMOND, 1990; TACKMAN y col., 1990).

El control que en este trabajo se ha llevado a cabo a través de la dieta por falta de met+cis (lote II) y met+cis y energía (lote III), intenta reseñar otro aspecto de cómo la concentración plasmática de aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina), al igual que los de cadena ramificada, varían directamente con el contenido proteico de la dieta (SUZIC y col., 1987; FERNSTROM y col., 1987; SOEMITRO y col., 1989) y su influencia en el tejido cerebral. También se cuenta con el estudio en las células rojas de la sangre. Se comparan los tres compartimentos en la gráfica XX.

La metionina y la treonina son los primeros aminoácidos limitantes de la síntesis de las proteínas endógenas (YOSHIDA y MORITORI, 1974; YOKOGOSHI y YOSHIDA, 1976). Los efectos por carencia de met+cis en una dieta son

el resultado, en parte, de la competición para el transporte al cerebro entre el aminoácido esencial limitante y los esenciales plasmáticos (TEWS y col., 1980; WURTMAN y col., 1981; PARDRIDGE, 1983; THURMOND, 1990).

Como ya se ha comentado en el apartado correspondiente a la Situación Bibliográfica de éste trabajo, los aminoácidos esenciales neutros (triptófano, tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina), que son necesarios para el metabolismo cerebral, son transportados desde el plasma al cerebro por un sistema de transporte específico que se halla localizado en los capilares cerebrales de la BHE (SMITH y col., 1987).

Deteniéndose en el estudio del efecto de cada una de las dos dietas sobre cada aminoácido en los diferentes compartimentos, plasma, eritrocitos y tejido cerebral, se pueden detallar los resultados obtenidos en las tablas 16, 27 y 37.

Así, los animales alimentados con la dieta II, presentan en plasma para el aminoácido precursor de catecolaminas, tirosina, una reducción respecto al control del 26% el día 4 y del 47% al final del periodo experimental (día 14). Estos resultados parecen estar de acuerdo con los hallazgos de YOUNG y HILL (1981) llevados a cabo en ratas malnutridas. En los glóbulos rojos aparece un descenso del 19% el primer día experimental (día 4), en tanto que el resto de los días se igualan los valores a los del lote control. A nivel cerebral, el descenso significativo que resulta los días 4 y 8 de la experiencia (del 47 y 63.3%, respectivamente) se llegan a recuperar e igualar al valor control el día 14.

Respecto al lote III, las variaciones plasmáticas que se producen son más importantes que en el caso del lote II, observándose una reducción del 66% el día 4, de acuerdo con ADIBI y col. (1973) en plasma de ratas privadas de proteína. Este descenso confirma lo observado por PETERS y HARPER (1985) sobre la relación de proporcionalidad directa existente entre los niveles de tirosina y el contenido proteico de la dieta, en un margen comprendido entre el 5 y el 20% de caseína en la misma. En las células rojas de la sangre se produce en estos animales una elevación de los valores del aminoácido mayor que en el caso del lote II, de manera que si durante el último día del experimento el lote II igualaba su valor al del control, el lote III, lo llega a superar en un 53%. El efecto de la dieta

baja en energía sobre el tejido cerebral de estos animales hace que, a diferencia del lote II, aparezca el último día de vida (día 8), una reducción del aminoácido tirosina, del 33.3%, no igualando su valor al de los controles como en el día 4 y como el lote II, de acuerdo con FERNSTRON y col. (1987).

El triptófano, aminoácido precursor de serotonina, no se ha valorado en cerebro, pero si se ha observado su variación en el compartimento sanguíneo. Así, se detecta un claro descenso, significativo, a nivel plasmático, respecto a los animales control, del 70% para los animales alimentados con dieta carente en met+ cis y baja en energía. Podemos tener en cuenta en este sentido que a estos bajos niveles de triptófano plasmático puede contribuir el hecho de que en la época de desarrollo en la que se encuentran las ratas de esta experiencia (44 días aproximadamente) es cuando se consiguen los máximos niveles de serotonina cerebral (ISHIMURA y col., 1989), lo que hace deducir que el flujo de este aminoácido al cerebro en esta época sea más abundante para su transformación en serotonina que se usará como neurotransmisor. Además, por otro lado hay que considerar que el triptófano es el único aminoácido que en sangre se encuentra unido a la albúmina en gran proporción, lo que influye enormemente en su captura por el cerebro. Esta unión de triptófano y albúmina en sangre no es de tipo covalente y se ve influida por otros componentes sanguíneos (ácidos grasos, drogas y diferentes macronutrientes) y el pH (CARDUCCI y col., 1991). El comportamiento de este aminoácido en los glóbulos rojos de la sangre no es tan homogéneo como en plasma. Así, los animales del lote II sufren una reducción en el nivel de triptófano eritrocitario que se hace máxima el día 8 de la experiencia (84% respecto a los animales control). Este mismo día resulta también interesante para los animales control, ya que se aprecia un valor muy elevado si lo comparamos con el nivel de aminoácido que aparece el día 4 y día 14.

Gran atención hay que prestar a los animales del lote III, los cuales presentan el día 4 un valor, en el nivel de triptófano eritrocitario, similar al del lote II pero inferior al de los animales control en un 48%. Sin embargo, el día 8 sufre un aumento espectacular (366% respecto al día 4), igualándose al control y superando al lote II en un 644%.

Por último, la fenilalanina, aminoácido capaz de convertirse en tirosina, presenta en el lote carente en met+ cis un valor plasmático inferior al

control en un 35% el día 4 y un 29% el día 14. Estos animales, en los eritrocitos no presentan diferencias significativas del aminoácido respecto al control, tan sólo les aparece una reducción del 40% el día 4 del experimento. Del mismo modo, en el tejido cerebral tampoco hay variaciones para este lote de animales, únicamente el día 4 sucede un aumento del 57% respecto a los controles en este mismo día, de acuerdo con FERNSTROM y col. (1987).

El lote de animales experimentales carente de energía (lote III) aún sufriendo un descenso del 35% (igual que el lote II) el día 4 en su valor de fenilalanina plasmática, consigue en días sucesivos aumentar la concentración hasta llegar a igualarse a los controles el último día de la experiencia. En este sentido, PETERS y HARPER (1985) señalan que dietas con un contenido de caseína inferior al 35%, la fenilalanina plasmática desciende al hacerlo el contenido proteico, lo que también sucede con el triptófano. En las células rojas de este lote de ratas, sucede a la inversa, es decir, el primer día del experimento presenta un valor de fenilalanina igual al de los animales controles (a diferencia del lote II que sufre un descenso) y un aumento de 181% respecto al lote I y de 172% en relación al lote II el día 8. A nivel cerebral, estos animales se comportan de igual modo que los del lote II, aumentando el valor del aminoácido respecto al control en un 109.5% el día 4 e igualándolo al final del experimento (día 8), de acuerdo con FERNSTROM y col. (1987).

Por tanto, una primera idea fundamental que se desprende del estudio de los aminoácidos individuales aromáticos libres en plasma (tabla 16) es que su tasa sufre un descenso significativo por efecto de las dietas carentes, observándose, en alguno de los casos, una acción especial, ya comentada, sobre dichos aminoácidos por falta de energía (lote III).

Esta disminución de los aminoácidos aromáticos individuales en plasma, se ve también reflejada cuando son expresados como suma total (tabla 17). Y es que, según detalla SUZIC y col. (1987), las concentraciones plasmáticas de aminoácidos aromáticos como suma total (AAA), al igual que los aminoácidos neutros (AAN) varían directamente con el contenido proteico de la dieta. Así, en este trabajo, aparecen reducciones de los AAA respecto al lote control del 29, 17 y 41% y del 56 y 21%, respectivamente para los lotes II y III los días 4, 8 y 14 de la experiencia. La reducción de la ingesta, junto a la captación por órganos como

el cerebro, en el que desempeñan un papel fundamental en la síntesis de neurotransmisores (WURTMAN y col., 1980), justifican los bajos niveles de AAA en plasma.

Igualmente, la suma total de AAN desciende en el plasma comparando con animales control (tabla 17). Este descenso es de un 34% en el lote II y de un 51% en el lote III, el día 4. El día 8 aparece una elevación significativa que elimina las diferencias con los animales alimentados con caseína y que se debe al aumento que experimentan los AAR dicho día, probablemente por liberación periférica de los mismos. El día 14, los AAN plasmáticos, en el lote II, vuelven a descender (43%), mientras la relación aminoácidos ramificados /aminoácidos aromáticos (AAR/AAA)- tabla 17- no se modifica en ningún momento de la experiencia.

Por otra parte, se sabe que el cerebro es uno de los órganos más sensibles a los desequilibrios aminoacídicos provocados por la dieta. El transporte de aminoácidos a través de la BHE regula la disponibilidad de nutrientes en éste órgano (PARDRIDGE, 1983) y muchas de las rutas del metabolismo cerebral se ven influenciadas por el aporte del precursor correspondiente (WURTMAN y FERNSTROM, 1975). El bajo valor de la Km para el transporte de aminoácidos a través de la BHE, en comparación a otros órganos, proporciona la base de la vulnerabilidad del cerebro de rata a los cambios en el aporte de aminoácidos (PARDRIDGE y CHOI, 1986), así, el metabolismo cerebral de la tirosina, triptófano y fenilalanina, es función no sólo de su concentración plasmática en sí misma, sino de la relación de cada uno de estos aminoácidos a la suma de las concentraciones de los restantes AAN que compiten por la entrada en el cerebro (FERNSTROM y FALLER, 1978).

En nuestros animales, la observación de esta razón (tablas 21 y 22) que constituye un parámetro esencial para predecir la disponibilidad de estos aminoácidos por el cerebro, indica que esta no se ve afectada por la carencia de metionina y cisteína en la dieta, con o sin restricción en la dieta, tal como se deduce en general de la falta de diferencias significativas respecto a los valores considerados normales, con la excepción de un ligero aumento de la fenilalanina en el lote II.

El día 4 se detecta una elevación en los animales del lote III, respecto a los controles, en la relación fenilalanina/tirosina. Ello podría ser explicado por una inhibición a nivel hepático de la enzima que hace posible la transformación de la fenilalanina a tirosina, fenilalanina hidroxilasa. Esta inhibición del enzima al principio del experimento, desaparecería tras su adaptación a una deficiencia proteico-energética en un tiempo posterior, como demuestran los valores, igualados a los del control, en estos animales el día 8.

Por otro lado, se pueden detallar las ligeras variaciones respecto a los datos que se consideran normales que surgen el día 4 para la relación isoleucina-/AAN-isoleucina, observándose un descenso para el lote carente en met + cis y una elevación para el lote que se encuentra sometido además a una restricción energética.

La reducción simultánea de los valores en el plasma de todos los AAN que provocan las dietas, impide posibles fenómenos de competencia en el transporte, según la afirmación de PARDRIDGE y CHOI (1986), en el sentido de que el contenido cerebral de cualquiera de los AAN es función directa de su nivel plasmático e inversa de cualquiera o la totalidad de los restantes AAN en el plasma.

Ya se ha detallado como a nivel de los glóbulos rojos sanguíneos (tabla 27) por efecto de la dieta carente en met + cis (lote II), el nivel de aminoácidos aromáticos considerados individualmente tiende a disminuir y en último término a igualarse respecto a los animales alimentados con dieta control, mientras que con la dieta carente en energía (lote III), los valores se elevan y los animales perecen. Dicho dato, es decir, el aumento de AAA en glóbulos rojos y la muerte de los animales, se puede interpretar como un índice de malnutrición proteico-energética.

Estas mediciones están en concordancia con las realizadas en los AAA como suma total (tabla 28). Es sabido, que las células rojas desempeñan su papel movilizandolos aminoácidos hacia zonas de menor concentración (AOKI y col., 1972). En ellas ha resultado en esta experiencia que tanto la suma de AAA como la de AAN, en el lote II, presentan valores inferiores al control el día 4

(alrededor de un 25% en ambos casos), para después aumentar igualándose al control.

El lote con restricción energética, después del descenso en la concentración eritrocitaria de estos aminoácidos, que tiene lugar el día 4, sufre un brusco aumento el día 8 superando incluso al control en un 82 y 90% en el caso de los aromáticos y neutros, respectivamente, mientras la relación entre los aminoácidos de cadena ramificada y los aromáticos (AAR/AAA), en estos animales, únicamente presenta diferencias significativas con los restantes lotes el día 4, por el descenso de los ramificados en ese momento, lo que también explica la menor relación AAR/AAA (25%) en el lote II el día 14.

La presencia en eritrocitos de cada uno de los aminoácidos neutros, ramificados y aromáticos, en relación a la suma total (tablas 31 y 32), se ve modificada por la dieta carente de met+cis (lote II), en el caso de isoleucina y valina en sentido descendente y en la leucina con aumentos significativos, que también se producen en el caso de la tirosina el último día del experimento.

Así la relación isoleucina/AAN-isoleucina, desciende desde el día 4, presentando el día 14 un valor de un 16% inferior al control, mientras el descenso, en el caso de la valina, es de un 20% dicho día. Esta reducción está ocasionada por sendas disminuciones de los valores de los aminoácidos isoleucina y valina, mientras la leucina se destaca también como uno de los mas afectados, aunque en este caso en sentido inverso, aumentando en relación a los demás AAN.

Por su parte, en el lote III, la valina/AAN-valina presenta valores significativamente inferiores al control: 41 y 21% respectivamente, los días 4 y 8. Este último día, los niveles de valina en glóbulos rojos aumentan significativamente, sin embargo, la relación continúa siendo inferior al control, por el enorme incremento en los AAN dicho día (tabla 28).

En la tabla 32 también se deja constancia de la relación fenilalanina-/AAN-fenilalanina, la cual presenta un incremento significativo para el lote carente de aminoácidos azufrados y con restricción energética (lote III) respecto a los animales alimentados con caseína. Del mismo modo se puede, en esta misma tabla, evaluar la elevación que ocurre en el lote III respecto a los animales control para

la relación tirosina/AAN-tirosina. Dicha elevación pasa de ser de un 37% el día 4 a un 26% el día 8, debido al enorme aumento que experimenta este último día (día 8) la suma de AAN (tabla 28) y que supera en magnitud a la tirosina.

Los aminoácidos aromáticos libres estudiados en cerebro, tirosina y fenilalanina (tabla 37), no son afectados de igual forma por las dietas carentes. De manera que la fenilalanina no sufre variaciones significativas mientras que la tirosina tiende a disminuir, aunque el lote II iguala su concentración a la del control el último día de la experiencia.

Estas ligerísimas variaciones en la concentración de tirosina y fenilalanina cerebrales, se ven reflejadas en la tabla 38 como suma total de AAA en donde se observa la invariabilidad de los valores al producirse una compensación entre ellos. Esta estabilidad de conjunto en los niveles de AAA se ve favorecida por la gran movilidad de aminoácidos que sucede a nivel muscular, sobre todo en los animales del lote III, que hace que lleguen con mayor fluidez dichos aminoácidos a sangre y de aquí al tejido cerebral.

Del mismo modo se observa en la tabla 38, que la suma de AAA y AAR (AAN) en el cerebro no se altera de forma significativa a pesar del suministro de dietas carentes en met+cis y de met+cis con la mitad de energía, respecto a los animales alimentados con dieta control, de acuerdo con FERNSTROM y col. (1987) y sin hacer aprecio al ligero aumento producido el día 4. Ello se debe según SMITH y col. (1987) a que el sistema de transporte es saturado con los AAN y a que las concentraciones plasmáticas de AAN tienden a aumentar o disminuir en grupo, en nuestro caso, disminuyen. Cuando cambian las concentraciones plasmáticas en la misma dirección y extensión, las alteraciones en la entrada al cerebro, serán minimizadas por competición por el transportador (SMITH y col., 1985). La estabilidad de los AAN en cerebro como sucede en este estudio experimental, tanto en la dieta control como en las carentes, refleja la constancia de los niveles cerebrales de AAN, aunque el sistema de transporte es susceptible a los grandes desequilibrios en las concentraciones plasmáticas, como sucede en las hiperacidemias y encefalopatía hepática (DANIEL y col., 1977; MANS y col., 1982).

Respecto a la relación AAR/AAA, plasmada en esta misma tabla, se

observa para ambas dietas carentes un aumento significativo los días 4 y 8. Al final del periodo experimental aparece una recuperación de los valores en el lote II, hasta llegar a igualarse al grupo de animales control. Ello probablemente se deba a que las concentraciones de isoleucina, leucina y valina son superiores a las de los AAA, ya que estos últimos pueden ser consumidos para síntesis de catecolaminas y para síntesis proteica.

En resumen, con motivo de las carencias y desequilibrios nutricionales inducidos en esta experiencia, el compartimento más afectado en sus niveles de AAA, al igual que sucedía con los ramificados, es el plasma, con descensos significativos a lo largo del tiempo experimental. Sin embargo, en las células rojas de la sangre sólo se detecta un descenso importante en el nivel de triptófano de los animales del lote II.

La tendencia a aumentar en el tiempo se aprecia en la mayoría de los AAA de los eritrocitos, siendo esta situación mucho más evidente en el lote III.

El tejido cerebral, por su parte, logra mantener los valores de fenilalanina y tirosina al final del periodo experimental, con la excepción del descenso que se hace notar en la tirosina del lote III, probablemente debido, como ya se ha mencionado, a la inhibición de fenilalanina hidroxilasa a nivel hepático.

5.7.4.- Aminoácidos básicos y azufrados (tablas 18,19,29,39)

Arginina (Grafica XXII)

La arginina es un aminoácido básico, considerado como no esencial bajo condiciones normales, aunque su administración se hace necesaria en algunas patologías.

En el organismo, este aminoácido es formado principalmente en el ciclo de la urea a nivel hepático.

El amoníaco producido en el catabolismo de los aminoácidos, en parte es reutilizado, otra fracción forma ácido úrico y urea y parte es eliminado como tal.

De los datos que se desprenden de la tabla 3 y que ya se han comentado, es posible deducir la elevada excreción de urea que presentan los animales deficientes y de aquí la importancia que adquiere la arginina.

A tal situación se llega como consecuencia de la carencia en las dietas del aminoácido iniciador de la síntesis proteica, la metionina, que hace que en órganos no vitales, como el músculo esquelético, se vea reducida drásticamente la formación de proteínas, lo que conlleva un exceso de aminoácidos cuyos grupo aminos, potencialmente tóxicos, bien forman alanina y esta glucosa vía gluconeogénica o son eliminados en forma de urea (mayor importancia), ácido úrico o amoniaco.

Dado que el cerebro constituye un órgano esencialmente vital para el organismo, el conjunto de procesos adaptativos que surgen como consecuencia de una MPE mantiene, en lo posible, la formación de proteínas. En este sentido, la arginina contribuye manteniendo sus valores en este tejido (tabla 39) gracias al descenso significativo que experimenta el aminoácido a nivel plasmático (tabla 18) detectable el último día de la experiencia (68% el lote II, el día 14 y 61% el lote III, el día 8) y a la actividad transportadora de los glóbulos rojos, que al pasar por los capilares musculares, captan arginina para llevarla a órganos tan vitales como el cerebro. Aparecen así en los eritrocitos variaciones en la tasa del aminoácido que se hace significativamente alta especialmente el día 8 (103% para el lote II y 258% para el lote III, respecto al control) aunque el día 14 el lote II consigue la normalidad (tabla 29).

Histidina

Aunque algunos autores consideran que la histidina puede, en pequeña proporción, ser sintetizada en los tejidos de mamíferos, en general, es clasificada como aminoácido esencial (VISEK, 1984). Esta esencialidad hace que la MPE sea un buen modelo para estudiar el metabolismo de la histidina.

Estudios contradictorios surgen a la hora de definir el nivel plasmático de histidina en humanos con MPE. Mientras que trabajos como los realizados por MERCER y col. (1989) o ANTENER y col. (1982) estiman valores

aumentados respecto a la normalidad, otros como y SOEMITRO y col. (1989) observan descensos. Aún sin encontrar una explicación válida, este trabajo contribuye a la incógnita presentada, aportando datos obtenidos en ratas en favor de la segunda hipótesis. PETER y HARPER (1987) también observan una reducción de arginina e histidina plasmáticas con una dieta sin proteínas.

La carencia de metionina y cisteína en las dietas administradas a los animales del lote II supone una reducción plasmática (tabla 18), que aumenta, en el tiempo, en relación a los animales alimentados con caseína del orden del 84% el día 14. Se producen descensos aún mas marcados y durante todos los días del experimento, en los valores de histidina en plasma del lote de ratas con restricción de energía (53.87% el día 8).

De igual modo, se han calculado valores disminuidos, respecto al lote control, de la histidina eritrocitaria en ambos lotes carentes (tabla 29), más detectable al final del periodo experimental (40% en el lote II el día 14 y 55% en el lote III el día 8).

Tan sólo en el lote III, el día 8, se estima una elevación de 600% de la histidina cerebral (tabla 39). Podría suponer este dato el resumen de la influencia que tiene una MPE sobre este aminoácido en dicho tejido, pese a que en el resto de los días y lotes se mantenga igualado al control. Este aumento, que según MERCER y col. (1989) siempre sucede, afecta a la función del sistema nervioso central y hace que la relación histidina/AAN se eleve, lo que afecta al transporte de aminoácidos a través de la barrera hematoencefálica. Dado que el transportador de AAN es usado con mayor preferencia por la histidina que por estos AAN (PARDRIDGE, 1983), el incremento de la histidina cerebral sería a costa del descenso de los AAN en el tejido aunque en este trabajo no se llegue a evidenciar (tabla 38).

Aminoácidos azufrados

En este trabajo se ha llevado a cabo el análisis de la metionina y la taurina en plasma (tabla 19) y de la taurina cerebral (tabla 39).

De este estudio y apoyándonos en experiencias como las de MEREI

y GALLYAS (1964), GLAZENBURG y col. (1983) y TANAKA y col. (1990), se puede deducir que, si bien la carencia de aminoácidos azufrados- especialmente de metionina- se puede relacionar con una marcada disminución de la síntesis proteica, la captura de metionina por el cerebro no se ve afectada por los cambios en el nivel de aminoácidos circulantes en sangre durante un tiempo experimental relativamente corto de 10 días. Tampoco es afectada, según este trabajo, por el nivel de metionina en plasma, ya que el aminoácido en este compartimento se hace invariable, supuestamente debido a un conjunto de procesos adaptativos que procuran la movilización del aminoácido en tejidos periféricos, a un nivel tal que permita la conservación de la síntesis proteica en órganos tan vitales como el cerebro. Ello se ve confirmado con la escasa variación del peso de este órgano.

La formación de taurina a partir de cisteína ha sido demostrada por numerosos autores (TANAKA y col., 1990). Por tanto, inevitablemente se puede pensar que cuando en estudios como este, se alimentan a los animales con dietas carentes en sus precursores inmediatos, metionina y cisteína, la síntesis de este aminoácido azufrado se ve limitada. Sin embargo, este efecto a nivel plasmático tan sólo se detecta en este experimento al final del periodo en los animales del lote II sin restricción energética. Y es que la gran abundancia de este aminoácido en el pool intracelular (JACOBSE y SMITH, 1968) suaviza sus modificaciones plasmáticas.

Dichos valores de taurina en plasma se traducen a nivel cerebral en descensos significativos respecto a los animales control del 39.33%, para el lote II el día 14 y del 23.5%, para el lote III el día 8.

5.7.5.- Sumas de aminoácidos: Esenciales, no esenciales y totales (tablas 20,23,30,33,34,40,41,42)

Como resumen, en este trabajo se han calculado las variaciones que experimentan el conjunto de aminoácidos en plasma (tabla 20), eritrocitos (tabla 30) y cerebro (tabla 40).

En desacuerdo con el trabajo realizado por MERCER y col. (1989) en ratas con kuashiorkor, el nivel de aminoácidos esenciales (AAE) en plasma aparece aumentado en los animales del lote II (120 y 90% los días 8 y 14,

respectivamente), aunque no se aprecian variaciones significativas en el lote III al final de la experiencia, comparado con los animales control. En cuanto a los AANE, en el lote II apenas se producen variaciones significativas, a excepción de un ligero aumento el día 8, mientras que en el lote III, por ser algunos de los AANE gluconeogénicos, disminuyen debido a la falta de energía de la dieta, para así mantener los niveles plasmáticos de glucosa por el hígado mediante el ciclo glucosa-alanina. Ello contribuye a que la relación aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales (AAE/AANE) aparezca aumentada respecto a los animales alimentados con caseína, tanto para el lote II como para el III. Como se puede observar, el último día de la experiencia (día 14) es invariable el valor de los AANE para el lote II (pese al aumento que se detecta el día 8) mientras que en el lote III su valor está disminuido tanto el día 4 (43%) como el día 8 (45%), por la razón ya mencionada.

Así, la suma total de aminoácidos esenciales y no esenciales (AAT) resulta, con relación al control, elevada en el caso del lote II y disminuida para el lote III.

Relaciones muy diferentes al plasma se observan en glóbulos rojos. En este compartimento los AAE no sufren modificaciones en ambos lotes experimentales, aunque se detectan en el lote II elevaciones desde el primer día en la suma de AANE del orden del 43% no apreciándose variaciones en el caso del lote III. Así, la relación AAE/AANE queda disminuida significativamente para ambos lotes carentes (23.7 y 12% los días 14 y 8 para los lotes II y III, respectivamente) y la suma de aminoácidos (AAT) resulta aumentada para el lote II e invariable para el III. Siempre realizando las comparaciones con el lote control de animales.

Por su parte, el cerebro presenta al final de la experiencia estabilidad en los valores de AAE y AAE/AANE en el lote II y AANE, AAE/AANE y AAT en el lote III. Mientras que se detectan aumentos en los AANE y AAT del lote II y AAE del lote III. En el lote II se puede apreciar un aumento muy significativo de los AAE a lo largo de la experiencia. Así se hace aumentar la relación AAE/AANE en ambos lotes carentes. La acumulación de AAE en el cerebro al final del experimento con ambas dietas carentes, indica la invulnerabilidad de este órgano

frente a indicios dietarios adversos, mediante un proceso de adaptación, conservando con más avidez los AAE.

Por otro lado y concluyendo este trabajo, se ha querido resaltar la importancia de algunos índices bioquímicos que se encuentran relacionados con el metabolismo de la glucosa (tablas 23, 33 y 41) y que destacan en estados de malnutrición.

Estos índices, alanina/tirosina, alanina/leucina y alanina/AAR, aparecen en los animales alimentados con dietas carentes en met+cis (lote II) con valores normales comparados con el lote control al final de la experiencia, tanto en plasma como en glóbulos rojos y cerebro. Sin embargo, se aprecia la importancia que tienen estos aminoácidos en la gluconeogénesis cuando se observan los valores de estos cocientes intensamente reducidos en los animales alimentados con dietas carentes en met+cis pero además con restricción energética, lote III. Este descenso en los valores de los índices bioquímicos mencionados se hace visible en sólo dos de los compartimentos estudiados, plasma y eritrocitos, ya que son el depósito desde donde el tejido cerebral consigue estos aminoácidos y así hace que se mantengan sus valores, bajo las condiciones y tiempo experimentales, tanto en el lote II como en el III. Es posible que se produzca un mayor transporte de tirosina por los eritrocitos como consecuencia del descenso de insulina plasmática que impide la entrada de dicho aminoácido al músculo y favorece la salida por proteólisis miofibrilar.

La relación alanina/tirosina en cerebro, aumenta el día 8 en el lote II y posiblemente en el III, comparados ambos lotes con el control. Se podría ver justificado este comportamiento por la utilización de la tirosina en el cerebro para la síntesis de catecolaminas y proteosíntesis.

Las relaciones alanina/leucina y alanina/AAR en este órgano, no se modifican al final del periodo experimental con ambas dietas carentes, ya que tanto a la alanina como los AAR se mantienen constantes en dicho tejido.

Por último, en las tablas 24, 34 y 42 se describen los valores calculados para los cocientes serina+glicina+alanina/AAR y glicina/valina en plasma, eritrocitos y cerebro, respectivamente.

Fácilmente se detectan elevaciones significativas en las ratas que componen el lote II especialmente los días 8 y 14 en los tres compartimentos. El día 4, en el lote III también aparece una elevación de glicina/valina en el caso del plasma y glóbulos rojos. FAUS y col. (1984) también detectan aumentos de los índices serina+glicina+alanina/AAR y glicina/valina en plasma de niños con MPE. El resto de los días en los tres compartimentos estudiados se observan valores en estas relaciones equilibrados con los del control.

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Este trabajo pone de manifiesto las alteraciones de algunos parámetros bioquímicos que surgen como consecuencia de la malnutrición generada en ratas Wistar macho al administrarles dietas sintéticas de aminoácidos cristalinos, carentes de metionina y cisteína (lote II) y carentes de metionina y cisteína con la mitad de energía (lote III), frente a un control alimentado con 10% de caseína más D-L-metionina (0.2%).

El estudio se ha centrado en la respuesta metabólica que experimenta el tejido cerebral ante las carencias dietarias mencionadas y se ha completado con la determinación y comparación de algunas constantes sanguíneas y urinarias.

Las alteraciones metabólicas y ponderales observadas ponen de manifiesto índices bioquímicos de MP y MPE que pueden ser extrapolables en clínica humana.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten señalar las conclusiones siguientes:

1.- La carencia dietaria de metionina+cisteína y esta dieta con la mitad de energía, provoca un estado de malnutrición proteica y proteico-energética, respectivamente, en los animales de experimentación.

2.- Se produce una reducción de la ingesta y del peso corporal en ambos lotes carentes, siendo superior en el lote deficiente en energía.

3.- El balance de nitrógeno desciende y llega a hacerse negativo en el lote con deficiencia energética. Así mismo, en ambos lotes carentes aumentan los niveles plasmáticos y urinarios de urea, lo que corrobora los valores del balance de nitrógeno. Ello induce a pensar que se produce un incremento de la proteólisis intracelular y son liberados aminoácidos los cuales son oxidados al igual que los ingeridos en la dieta.

4.- En orina, la creatinina no se modifica debido a que el catabolismo proteico muscular tiende a disminuir como resultado de la adaptación por la carencia de metionina y cisteína.

5.- En cuanto al colesterol plasmático, se observa una disminución, siendo más acusada al final de la experiencia, debido a la falta de aminoácidos- metionina y cisteína- en la dieta.

6.- La glucemia se mantiene en los lotes carentes en forma semejante a los controles, no sucede así con los valores plasmáticos de insulina, los cuales van descendiendo a medida que transcurre el proceso y son más bajos en los animales con restricción energética en su dieta.

7.- En las proteínas plasmáticas totales, se produce un descenso en ambos lotes carentes a partir del día 8, no apreciándose el efecto de la restricción energética. De las fracciones proteicas plasmáticas, la albúmina disminuye en el lote carente en met+cis el último día de la experiencia. Las globulinas alfa y gamma no se modifican y la beta-globulina disminuyen en el lote carente de energía el día 8. Por tanto, son la albúmina y la beta-globulina las proteínas que dan los primeros signos de malnutrición a este nivel.

8.- El peso cerebral y el contenido proteico soluble se mantienen hasta el día 14, momento en que descienden ya que las reservas corporales de nutrientes- en especial la metionina- disminuyen a niveles en los que no son transportados eficientemente a este órgano vital, lo que va en detrimento de la síntesis proteica.

El índice ponderal cerebro-somático (peso cerebro/peso corporal) aumenta en los lotes carentes los días 4 y 8 de la experiencia. El día 14, el lote II

mantiene los valores como consecuencia de la disminución del peso cerebral en este día.

9.- El contenido de DNA cerebral aumenta el día 4 y comienza a descender a lo largo de la experiencia hasta hacerse significativo el día 14. Estos valores se correlacionan con la relación proteínas/DNA, número de núcleos y tamaño celular. La actividad DNAsa ácida cerebral desciende en los lotes carentes, lo cual contribuye al mantenimiento, dentro de lo posible, de los niveles de DNA.

10.- El contenido de RNA se reduce en el cerebro del lote carente de met+cis a lo largo del proceso experimental, siendo máxima el último día de la experiencia, como consecuencia del aumento de la actividad RNAsa ácida por órgano, por mg de proteína y por DNA. Influyendo de forma negativa en la síntesis de proteína cerebral. El aumento del RNA en el lote con la mitad de energía respecto al lote II y semejante al control, indica un predominio de la síntesis sobre la degradación, a pesar de la alta actividad RNAsica. La falta de energía hace descender la síntesis proteica pero no la capacidad (RNA/proteína) de poderla llevar a cabo.

11.- Las enzimas lisosomales, fosfatasa ácida y alcalina, se incrementan el día 4 de la experiencia (índice de involución relacionable con efectos degradativos tisulares), a partir de este día, la actividad se va igualando a los controles por un efecto de adaptación. En cuanto a la beta-glucuronidasa, no se observan modificaciones de su actividad en el cerebro.

Considerando que las reacciones de transaminación son parte esencial en los procesos oxidativos de los aminoácidos, el descenso sufrido por la GPT y el mantenimiento de la actividad GOT en los animales estudiados se pueden interpretar como un mecanismo de protección que lleva a cabo el cerebro con el fin de conservar los AAR para así mantener al máximo los niveles de síntesis proteica cerebral.

12.- Los AAR plasmáticos y eritrocitarios disminuyen y al estar dificultada la síntesis proteica muscular, son metabolizados vía gluconeogénica en el hígado previa transaminación en el músculo estriado y liso de la pared intestinal para formar alanina. El cerebro parece no recibir señales durante los 14 días del

experimento en forma de cambios en los niveles de AAR, siendo los altos valores de isoleucina la excepción, quizás producidos por la competición entre los AAN al atravesar la BHE.

13.- Las carencias nutricionales ensayadas en este trabajo hacen que el organismo animal tienda a conservar un equilibrio metabólico, para lo que pone en marcha la vía gluconeogénica. Aminoácidos como ácido aspártico, asparragina, glutamina y alanina sufren descensos a nivel sanguíneo debido a su participación en la formación de glucosa por dicha vía, al mismo tiempo que en el cerebro no se producen variaciones respecto a la normalidad.

A costa de la liberación de ácido glutámico realizada por el músculo, tanto en plasma como en los eritrocitos aparece su valor aumentado, lo que facilita que el cerebro mantenga un nivel normal en este aminoácido excitatorio.

La falta de metionina directamente favorece el aumento de glicina, serina y treonina en sangre, lo que está en favor de mantener los niveles normales de estos aminoácidos en el cerebro de los animales tratados.

En realidad todos estos aminoácidos varían sus rutas metabólicas normales para favorecer la gluconeogénesis tan necesaria bajo las condiciones experimentales elegidas.

14.- Tanto la suma total de AAA como los niveles individuales de cada uno de ellos se detectan en el plasma por debajo de la normalidad, debido a que, lo mismo que los AAN, varían directamente con el contenido proteico de la dieta. Por tanto, la disminución de la ingesta unido a la captación por el cerebro de estos aminoácidos para la síntesis de neurotransmisores hacen que se obtengan estos niveles. La reducción generalizada en los valores plasmáticos de AAN que provocan las dietas, impide posibles fenómenos de competencia en su transporte a través de la BHE por lo que se observa una gran tendencia a que los AAA se mantengan dentro de los niveles normales en el tejido cerebral.

El aumento de los AAA en glóbulos rojos y la inviabilidad de los animales se puede interpretar como un índice de MPE.

15.- En lo que respecta a los aminoácidos básicos, se detecta en plasma descensos significativos tanto en arginina como en histidina. En el tejido cerebral hay que destacar el mantenimiento del nivel de arginina y el aumento producido el día 8 del experimento en la histidina de los animales con restricción energética. Los eritrocitos consiguen estabilizar la tasa de arginina y disminuir la histidina.

16.- La gran abundancia de taurina en el pool intracelular colabora para que no se originen fuertes variaciones en sus valores plasmáticos cuando nos enfrentamos ante una deficiencia de sus precursores, metionina y cisteína. Ello no evita que en este experimento los niveles de taurina cerebral se vean disminuidos.

La evolución ponderal normal del cerebro de los animales tratados hace pensar que la metionina ha debido ser capturada sin dificultad desde la sangre para mantener la síntesis proteica y el metabolismo hasta casi el final del experimento.

17.- La invulnerabilidad inicial del cerebro adulto frente a las condiciones dietarias impuestas y durante el tiempo experimental estudiado se hace evidente cuando son observados valores normales de AAE. La relación AAE/AA-NE se llega a estabilizar a diferencia de lo que sucede en plasma y eritrocitos que aumenta y disminuye respectivamente.

18.- En el cerebro adulto, a diferencia de otros órganos, la malnutrición tiende a inhibir el catabolismo proteico para conservar las proteínas estructurales.

CONCLUSION GENERAL:

El estado de MP y MPE creado por carencia de metionina y cisteína y deficiencia energética, se hace claro cuando se observa el descenso sufrido por parámetros tan importantes como ingesta, peso corporal, balance de nitrógeno (se llega a hacer negativo en MPE), proteínas plasmáticas totales y albumina, beta-globulinas e insulina en sangre. El aumento de la urea plasmática y urinaria así como de los AAA en eritrocitos y de la relación AAE/AANE plasmática apoyan también la teoría.

En este proyecto se ha hecho evidente la intensa influencia de las restricciones dietarias impuestas sobre el metabolismo general del animal al haber sido observadas serias variaciones a nivel muscular. Ello junto con las mediciones realizadas en el patrón aminoacídico de plasma, glóbulos rojos y tejido cerebral, dejan vislumbrar algunos índices de malnutrición proteica y proteico-calórica. Se observa así en sangre un descenso en las concentraciones de AAR, AAA y aminoácidos básicos y en ocasiones (caso del lote II) una elevación muy significativa de algunos aminoácidos gluconeogénicos (ácido glutámico, serina, glicina y treonina) que conduce a un aumento de la suma total de aminoácidos, por inhibición de la síntesis protéica y tal vez por incremento del catabolismo a nivel muscular.

Se puede suponer que a costa de los cambios metabólicos sufridos por la mayoría de los tejidos del organismo, el tejido cerebral al ser un órgano vital, ante cualquier circunstancia adversa el organismo trata de protegerlo, de modo que la carencia dietaria de metionina y cisteína y la reducción energética por la que han pasado los animales de experimentación durante 14 días no ejerce un efecto demasiado intenso hasta llegada la última etapa del experimento. Ello principalmente es debido a que los animales presentan un cerebro ya desarrollado aunque se encuentran en periodo de crecimiento, lo que supone que la mayoría de las alteraciones sufridas en este tejido probablemente tengan carácter reversible. El descenso observado el día 14 en el peso cerebral, proteínas solubles, DNA, proteína/DNA, nº de núcleos y tamaño celular, hace suponer que si hubiera sido viable el experimento durante un tiempo mayor, el efecto sobre el cerebro sería mucho más marcado e incluso irreversible. Los claros descensos del RNA, DNAsa ácida, GPT y taurina dan idea de la agresión sufrida por este órgano que lucha por mantener normales los valores de la enzima GOT, AAR, AAA, arginina, aminoácidos gluconeogénicos, glicina, serina, treonina, AAE y AAE/AANE.

ABREVIATURAS USADAS

AA:	Aminoácido/s
AAA:	Aminoácidos aromáticos
AAR:	Aminoácidos ramificados
AAN:	Aminoácidos neutros
AANL:	Aminoácidos neutros de cadena larga
AAE:	Aminoácidos esenciales
AANE:	Aminoácidos no esenciales
AAT:	Aminoácidos totales
BHE:	Barrera hematoencefálica
MP:	Malnutrición proteica
MPE:	Malnutrición proteico-energética
VB:	Valor biológico
NPU:	Utilización neta de la proteína
Ala:	Alanina
Arg:	Arginina
Asn:	Asparagina
Asp:	Acido aspártico
Cys:	Cisteína
Gln:	Glutamina
Glu:	Acido glutámico
His:	Histidina
Ile:	Isoleucina
Leu:	Leucina
Lys:	Lisina
Met:	Metionina
Phe:	Fenilalanina
Ser:	Serina
Thr:	Treonina
Trp:	Triptófano
Tyr:	Tirosina
Val:	Valina

8.- BIBLIOGRAFIA

- ABUMRAD, N. y MILLER, B.M. (1983). "The physiological and nutritional significance of plasma free amino acid levels". JPEN, 7, 163-170.
- ABUMRAD, N., RABIN, D., WISE, K.L. y LACY, W.W. (1982). "The disposal of an intravenously administered amino acid load across the human forearm". Metabolism, 31, 463-470.
- ADIBI, S.A., MODESTO, T.A., MORSE, E.L. y AMIN, P.M. (1973). "Amino acid levels in plasma, liver and skeletal muscle during protein deprivation". Am. J. Physiol., 225, 3, 408-414.
- AGHARANYA, J.C. y WURTMAN, R.J. (1985). "Effect of dietary proteins and carbohydrates on urinary and sympathoadrenal catecholamines". Neurochem. Int., 7, 271-277.
- AGRAWAL, H.C., BONE, A.H. y DAVIDSON, A.N. (1970). "Effect of phenylalanine on protein synthesis in the developing rat brain". Biochem. J., 117, 325-331.
- AGRAWAL, H.C., DAVIS, J.M. y HIMWICH, W.A. (1966). "Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain". J. Neurochem., 13, 607-615.
- AGUILAR, T.S., BENEVENGA, N.J. y HARPER, A.E. (1974). "Effect of dietary methionine level on its metabolism in rats". J. Nutr., 104, 761-771.
- AGUILAR, T.S., BENEVENGA, N.J. y HARPER, A.E. (1972). "Efficiency of utilization of indispensable amino acids for growth by the rats". J. Nutr., 102, 1199-1208.
- ALLISON, J.B., ANDERSON, J.A. y SNEELEY, R.D. (1947). "Some effects of methionine on the utilization of nitrogen in the adult dog". J. Nutr., 33, 361-370.
- ALLISON, J.B., SEELEY, R.D., BROWN, J.H. y ANDERSON, J.A. (1946). "The evaluation of proteins in hypoproteinemic dogs". J. Nutr., 31, 237-247.

- AMES, A., III, y PARKS, J.M. (1976). "Functional homogeneity of leucine pool in retina cells". *J. Neurochem.*, 27, 1017-1025.
- ANDERSON, G.H. (1979). "Control of protein and energy intake: Role of plasma amino acids and brain neurotransmitters". *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 57, 1043-1057.
- ANDERSON, H.L., BENEVENGA, N.J. y HARPER, A.E. (1968). "Associations among food and protein intake, serine dehydratase and plasma amino acids". *Am. J. Physiol.*, 214, 1008-1013.
- ANDERSON, W.F., BOSCH, L., COHN, W.E., LODISH, H., MERRICK, W.C., WEISSBACH, H., WITTMANN, M.G. y WOOL, I.G. (1977). *FEBS. LETT.*, 76, 1-10. Citado en: WATERLOW, J.C., GARLICK, P.J. y MILLWARD, D.J. (1978). "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". North Holland Publishing Company. Amsterdam. Pag. 15-54.
- ANDERSON, S.A., TEWS, J.K. y HARPER, A.E. (1990). "Dietary branched-chain amino acids and protein selection by rats". *J. Nutr.*, 120, 52-63.
- ANTENER, I., VERWILGHEN, A.M., VAN GREERT, C. y MAURON, J. (1982). "Biochemical study of malnutrition. VI: Histidine and its metabolites". *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 53, 199-209.
- ANTHONY, L.E. y FALOONA, G.R. (1974). "Plasma insulin and glucagon levels in protein-malnourished rats". *Metabolism*, 23, 303-306.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). (1975). "Official methods of analysis". 12^a ed. Association of official analytical chemists. Washington. Pag. 15-17.
- AOKI, T.T., BRENNAN, M.F., MUELLER, W.A., SOELDNER, J.A., ALPERT, J.S., SALT, S.B., KAUFMAN, R.L., TAN, M.H. y CAHILL, G.F. (1981). "Leucine meal increases glutamine and total nitrogen from forearm muscle". *J. Clin. Invest.*, 68, 1522-1528.
- AOKI, T.T., BRENNAN, M.F., MULLER, W.A., MOORE, F.D. y CAHILL, G.F.Jr. (1972). "Effect of insulin on muscle glutamate uptake". *Clin. Invest.*, 5, 2889-2894.
- ASHIDA, A. y YOSHIDA, A. (1975). Proceedings of the 9th congress of nutrition, 3, 321-331. Basel. Karger. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Br. J. Nutr.*, 54, 499-508.
- ASHIDA, K. y YOSHIDA, A. (1972). "Nutritional specificities of essential amino acids and their relationship to evaluation of the nutritional quality of dietary proteins". *Proc. 9th Int. Congr. Nutrition. Mexico*, 3, 321-331 (Karger, Basel, 1975).
- ASHLEY, D.V.M. y ANDERSON, G.H. (1975). "Correlation between the plasma tryptophan to

neutral amino acid ratio and protein intake in the self-selecting weanling rat". *J. Nutr.*, 105, 1412-1421.

- ASSAN, R., EFENDIC, S., LUFT, R. y CESASI, E. (1981). "Dose-kinetics of pancreatic glucagon responses to arginine and glucose in subjects with normal and impaired pancreatic B cell function". *Diabetologia*, 21, 452-459.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. (1970). "Official methods of analysis". Association of official agricultural chemists. Washington, D.C. Pag. 800-801.

- AUSMAN, L.M., GALLINA, D.L. y HEGSTED, D.M. (1989). "Protein-calorie malnutrition in squirrel monkeys: Adaptative response to calorie deficiency". *Am. J. Clin. Nutr.*, 50, 19-29.

- AYUSO, M.S., VEGA, P., MANCHON, C.G. y PARRILLA, R. (1986). "Interrelation between gluconeogenesis and hepatic protein synthesis". *Biochimica et Biophysica Acta*, 883, 33-40.

- BACHELARD, H.S., CAMPBELL, W.J. y McILWAIN, H. (1962). "The sodium and other ions of mammalian cerebral tissues, maintained and electrically stimulated in vitro". *Biochem. J.*, 84, 225-232.

- BAJAJ, J.S. y RAO, G.S. (1987). "A mathematical model for insulin kinetics and its application to protein-deficient (malnutrition-related) diabetes mellitus". *J. Theor. Biol.*, 126, 491-503.

- BANAY-SCHWARTZ, M., GIUFFRIDA, A.M.E., De GUZMAN, T., SERSHEN, H. y LAJTHA, A. (1979). "Effect of undernutrition on cerebral protein metabolism". *Exp. Neurol.*, 65, 157-168.

- BAÑOS, G., DANIEL, P.M. y PRATT, O.E. (1978). "The effect of age upon the entry of some amino acids into the brain, and their incorporation into cerebral protein". *Dev. Med. Child Neurol.*, 20, 335-346.

- BASSIR, O. (1959). "Changes in the serum protein during treatment of kwashiorkor". *Nature Lond.*, 184, 2019.

- BENDER, D.A. (1986). "Uptake of triptophan into the brain: Dietary influences on serotonergic function". *Bibliotheca Nutr. Dieta*, 38, 82-86.

- BENDER, A.E. (1965). *Proceeding of the nutrition society*, 24, 190-196. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Br. J. Nutr.*, 54, 499-508.

- BENDER, D.A., BOULTON, A.P., COULSON, W.F. (1975). "A simple method for the study of tryptophan binding to serum albumin by small-scale equilibrium dialysis: Application to animal and human studies". *Biochem. Soc. Transact*, 3, 193-194.

- BENDITT, E.P., WOOLRIDGE, C.H., STEFEE, C.H. y FRAZIER, L.E. (1950). *J.Nutr.*, 40, 335-350. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Bri. J. Nutr.*, 54, 499-508.
- BENEVENGA, N.J. y HARPER, A.E. (1970). "Effect of glycine and serine on methionine metabolism in rats fed diets high in methionine". *J. Nutr.*, 100, 1205-1214.
- BENEVENGA, N.J. y STEELE, R.D. (1984). "Adverse effects of excessive consumption of amino acids". *Annu. Rev. Nutr.*, 4, 157-181.
- BERGMAN, E.N. y HEITMAN, R.N. (1978). "Metabolism of amino acid by the gut, liver, kidney and peripheral tissues". *Fed. Proc.*, 37, 1228-1232.
- BERGMAYER, H.U. (1963). "Methods of enzymatic analysis". H.V. Bergmeyer. Verlag Academic Press. N.Y. London. Pag. 941-948.
- BESSEY, O.A., LOWRY, O.H. y BROCK, M.J. (1946). "Method for the determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum". *J. Biol. Chem.*, 164, 321-329.
- BESSMAN, S.P. (1979). "The justification theory: The essential nature of the non-essential amino acids". *Nutr. Rev.*, 37, 209-220.
- BESSMAN, S.P. (1972). "Genetic failure of fetal amino acid justification: A common basis for many forms of metabolic, nutritional, and nonspecific mental retardation". *J. Pediatr.*, 81, 834-842.
- BEVERLY, J.L., GIETZEN, D.W. y ROGERS, Q.S. (1991). "Protein synthesis in the prepyriform cortex: Effects on intake of an amino acid-imbalanced diet by Sprague-Dawley rats". *J. Nutr.*, 121, 754-761.
- BEYLOT, M., CHAMBRIER, C., MONEGER, A. y COHEN, R. (1989). "Effect of small variations in insulin and glucose levels on plasma aminoacids concentrations". *Diabete and Metabolisme*, 15, 38-44.
- BEYNEN, C. y WEST, C.E. (1986). "The suitability of animal models for research". En: "Human nutrition: A workshop report". Eds. T.G. Taylor y N.K. Jenkins. Proceeding of the XIII International Congress of Nutrition, 1985. London. John Libbey and Company.
- BLOCK y MITCHELL (1946): *Nutr. Abstr. Rev.*, 16, 249. Citado en: HAMISH, N.M. y MARILYN, C.C. "The protein and amino acids". En: "Modern nutrition in health and disease". Lea and Febiger. Eds. R.S. Goodhard y M.E. Shils. (1980). 6ª edición. Philadelphia. Cap. 3, pag. 51-98.

- BLUSZTAJN, J.K. y WURTMAN, R.J. (1981). "Choline biosynthesis by a preparation enriched in synaptomes from rat brain". *Nature*, 290, 417-418.
- BOOTH, D.A., CHASE, A. y CAMPBELL, A.T. (1970). "Relative effectiveness of protein in the late stages of appetite suppression in man". *Physiol. Behav.*, 5, 1299-1302.
- BOOTH, R.F.S., PATEL, T.B. y CLARK, J.B. (1980). "The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non-precocial (rat) species". *J. Neurochem.*, 34, 17-25.
- BOOTH, D.A. y SIMSON, P.C. (1974). "Taste aversion induced by an histidine-free amino acid load". *Physiol. Psychol.*, 2, 349-351.
- BOOTH, D.A. y SIMSON, P.C. (1971). "Food preferences acquired by association with variations in amino acid nutrition". *Q. J. Exp. Psychol.*, 23, 135-145.
- BOURRE, J.M., POLLET, S., PATURNEAU-JOLLAS, M. y BAUMAN, N. (1978). "Fatty acid biosynthesis during brain development". En: "Enzymes of lipid metabolism". Plenum. Ed. S. Gatt, L. Freysz, P. Mandel. Pag. 17-26.
- BRENNER, R.R. (1981). "Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids". *Progress in Lipid Research*, 20, 41-47.
- BRIGHTMAN, M.W. (1977). "Morphology of blood-brain interfaces". *Exp. Eye. Res.*, 25, 1-25.
- BROZEK, J. (1956). "Body measurements and human nutrition". En: National Research Council. Committee on Nutritional Anthropometry, Wayne University Press. Detroit.
- BRUNO, J.F., SONG, J. y BERELOWITZ, M. (1991). "Regulation of rat hypothalamic preprogrowth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid by dietary protein". *Endocrinology*, 129, 1226-1232.
- BRUSH, M., WILLMAN, W. y SWANSON, P.P. (1947). "Amino acids in nitrogen metabolism with particular reference to the role of methionine". *J. Nutr.*, 33, 389-410.
- BUREAU, M.H. y OLSEN, R.W. (1991). "Taurine acts on a subclass of GABA_A receptors in mammalian brain in vitro". *Eur. J. Pharmacology-Molecular Pharmacol. Section*, 207, 9-16.
- BURROUGHS, E.W., BURROUGHS, H.S. y MITCHELL, H.H. (1940). *J.Nutr.*, 19, 363-384. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Bri. J. Nutr.*, 54, 499-508.

- BURTON, K. (1956). "The conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid". *Biochem. J.*, 62, 315-323.
- BUSE, M.G., BIGGERS, F., DRIER, C. y BUSE, J.F. (1973). "Effect of epinephrine, glucagon and the nutritional state on the oxidation of branched chain amino acids and pyruvate by isolated hearts and diaphragms of the rat". *J. Biol. Chem.*, 248, 697-706.
- BUZNIKOW, G.A. y SHMUKLER, Y.B. (1980). "Possible role of pre-nervous neurotransmitter in cellular interactions of early embryogenesis: A hypothesis". *Neurochem. Res.*, 6, 55-68.
- CALLOWAY, D.H. (1981). "Energy-protein relationships". En: "Protein quality in humans: Assessment and in vitro estimation". Eds. C.E. Bodwell, J.S. Adkins y D.S. Hopkins. Pag. 148-168.
- CALLOWAY, D.H. (1975). "Nitrogen balance of men with marginal intake of protein and energy". *J. Nutr.*, 105, 914-923.
- CALLOWAY, D.M., SPECTOR, H. (1954). "Nitrogen balance as related to calorie and protein intake in active young men". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2, 405-412.
- CARDUCCI, C., MORETTI, F., BIRARELLI, M. y ANTONOZZI, I. (1991). "Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the analysis of tryptophan, tyrosine and phenylalanine in biological samples". *J. Chromatography*, 553, 149-154.
- CARLSSON, A. y LINQVIST, M. (1978). "Dependence of 5-HT and catecholamine synthesis on precursor amino acid levels in rat brain". *Naunyn-schmeideberg's Arch Pharmacol.*, 303, 157-164.
- CARMONA DA MOTA, H., ANTONIO, A.M., LEITAO, G. y PORTO, M. (1990). "Late effects of early malnutrition". *The Lancet*, 335, 8698, 1158.
- CASPERSSON, T. (1950). "Cell growth and cell function". Norton. New York. Citado en: WATERLOW, J.C., GARLICK, P.J. y MILLWARD, D.J. (1978). "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". North Holland Publishing Company. Amsterdam. Cap. 14., pag. 443-479.
- CASTRO, C.A., TRACY, M. y RUDY, J.W. (1989). "Early-life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional-spatial discrimination task". *Behavioural Brain Research*, 32, 255-264.
- CERSOSIMO, E., WILLIAMS, P.E., HOXWORTH, B.T., LACY, W.W. y ABUMRAD, N.N. (1985). "Glutamine block lipolysis and ketogenesis of fasting". *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)*, 13, E248-E252.
- CERSOSIMO, E., WILLIAMS, P.E., RADOSEVICH, P.M., HOXWORTH, B.T., LACY, W.W.

- y ABUMRAD, N.N. (1986). "Role of glutamina in adaptations in nitrogen metabolism during fasting". *Am. J. Physiol.*, 250 (Endocrinol. Metab., 13), E622-E628.
- CIESLAK, D.G. y BENEVENGA, N.J. (1986). "Response of rats to diets of equal chemical escore: Effect of lysine or threonine as the limiting amino acid and of an amino acid excess". *J.Nutr.*, 116, 969-977.
- CLARK, H.J., PENG, Y. y SWENDEID, M.E. (1966). "Effect of different amino acid deficiencies on amino acid pools in rats". *J.Nutr.*, 90, 228-234.
- COATES, M.E. (1976). "The nutrition of laboratory animals". En: "The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals". UFAW. Churchill Livingstone. 5ª Edición. New York. Cap. 3, pag. 27-47.
- COHEN, E.L. y WURTMAN, R.J. (1979). "Nutrition and brain neurotransmitters". En: "Human nutrition". Eds. Alfin-Slater y Kritchevsky. New York. Vol. 1, pag. 103-132.
- COHEN, E.L. y WURTMAN, R.J. (1976). "Brain acetylcholine: Control by dietary choline". *Science*, 191, 561-562.
- CONDE, R.D. y SCORNIK, O.A. (1977). "Faster synthesis and slower degradation of liver protein during developmental growth". *Biochem. J.*, 166, 115-121.
- COOPER, A.J.L. (1983). "Biochemistry of sulfur-containing amino acids". *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 187-222.
- CORNBATH, D.R. y BROWN, M.J. (1988). "Influence of malnutrition on developing rat peripheral nerves". *Experimental Neurology*, 99, 2, 403-411.
- COTZIAS, G.C., PAPAVALIOU, P.S. y GELLENT, R. (1969). "Modification of parkinsonism: Chronic treatment with L-dopa". *New Engl. J. Med.*, 280, 337-345.
- COULTER, J.B.S., SULIMAN, G.I., OMER, M.I.A., MACFARLANE, S.B.J., MOODY, J.B. y HENDRICKSE, R.G. (1988). "Protein-energy malnutrition in northern Sudan: Clinical studies". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 42, 787-796.
- COWARD, W.A. y LUNN, P.G. (1981). "The biochemistry and physiology of kwashiorkor and marasmus". *Br. Med. Bull.*, 37, 19-24.
- COWARD, W.A., WHITEHEAD, R.G. y COWARD, D.G. (1972). "Quantitative changes in serum protein fractions during the development of kwashiorkor and in recovery". *Brit. J. Nutr.*, 28, 433-441.

- COX, W.M. JR., ELLINGSON, R.C. y MUELLER, A.J. (1953). *Pediatrics*, 11, 435. Citado en: MORRISON, A.B. y NARAYANA RAO, O.M. (1967). "Some relationships between protein and calories". *Wld. Rev. Nutr. Diet*, 7, 204-224.
- COYLE, J.T. y AXELROD, J. (1972). "Tyrosine hydroxylase in rat brain: Developmental characteristics". *J. Neurochem.*, 19, 1117-1123.
- CRACE, C.J., SWENNE, I. y MILNER, R.D.G. (1989). "Long-term follow-up after early protein-calorie malnutrition in young rats: Sex difference in glucose tolerance and serum insulin levels". *Metabolism*, 38, n° 10, 933-938.
- CRANDALL, E.A. y FERNSTROM, J.D. (1980). "Acute changes in brain tryptophan and serotonin after carbohydrate or protein ingestion by diabetic rats". *Diabetes*, 29, 460-466.
- CREMER, J.E., CUNNINGHAM, V.J., PARDRIDGE, W.M., BRAUN, L.D. y OLDENDORF, W.H. (1979). "Kinetics of blood-brain barrier transport of pyruvate, lactate and glucose in suckling, weanling and adult rats". *J. Neurochem.*, 33, 439-445.
- CREMER, J. E. y HEATH, D.F. (1974). "The estimation of rates of utilization of glucose and ketone bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data". *Biochem. J.*, 142, 527-544.
- CRNIC, L.S. (1976). "Effect of infantile undernutrition on adult learning in rat: Methodological and design problems". *Psychol Bull*, 83, 715-728.
- CRONE, C. (1971). "The blood-brain barrier-facts and questions". En: "Ion homeostasis of the brain". Eds. B.K. Siesjo y S.C. Sorensen. Copenhagen: Munksgaard. Pag. 52-62 (Alfred Benzon Symp. III).
- CRONE, C. (1965). "Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue". *J. Physiol.*, 181, 103-113.
- CROWE, P.J. y ROYLE, G.T. (1988). "Glucose kinetics in protein depletion-effect of glucose infusion in the fasted rat". *J. Nutr.*, 118, 1240-1244.
- CROWELL, P.L., BLOCK, K.P., REPA, J.J., TORRES, N., NAWABI, M.D., BUSE, M.G. y HARPER, A.E. (1990). "High branched-chain α -keto acid intake, branched-chain α -ceto acid dehydrogenase activity, and plasma and brain amino acid and plasma keto acid concentrations in rats". *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 313-319.
- CULLEY, W.J., SAUNDERS, R.N., MERTZ, E.T. y JOLLY, D.G. (1962). "Effect of phenylalanine and its metabolites on brain serotonin and plasma tryptophan level". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113, 645-648.

- CURTIS, D.R., HOSLI, L y JOHNSTON, G.A.R. (1968). "A pharmacological study of the depression of spinal neurons by glycine and related amino acid". *Exp. Brain Res.*, 6, 1-18.
- CHEEK, D.B. y HILL, D.E. (1970). "Muscle and liver cell growth: Role of hormones and nutritional factors". *Fed. Proc.*, 29, 1503-1509.
- CHEEK, D.H., HOLT, A.B., IONDON, V.T., ELLENBERG, J.H., HILL, D.G. y SEVER, J.I. (1976). *Am. J. Nutr.*, 1149.
- CHEREL, Y., ATTAIX, D., ROSOŁOWSKA-HUSZCZ, D., ARNAL, M. y LE MAHO, Y. (1991). "Brief fasting decreases protein synthesis in the brain of adult rats". *Neurochemical Research*, 16, 8, 843-847.
- CHEREL, Y. y LE MAHO, Y. (1991). "Refeeding after the late increase in nitrogen excretion during prolonged fasting in the rat". *Physiology and Behavior*, 50, 345-349.
- CHESNEY, R.W., GUSOWSKI, N. y DABBAGH, S. (1985). "Renal cortex taurine content regulates renal adaptative response to altered dietary intake of sulfur amino acids". *J. Clin. Invest.*, 76, 2213-2221.
- CHOI, Y.S. y SUGANO, M. (1988). "Effects of dietary alpha-and gamma-linolenic acid on lipid metabolism in young and adult rats". *Annals Nutr. Metabo.*, 32, 169-176.
- CHRISTENSEN, H.N. (1982). "Interorgan aminoacid nutrition". *Physiol. Rev.*, 62, 1193-1227.
- CHUBAKOV, A. R., GROMOVA, E.A., KWOVALO, G.V., SARKISON, E.F. y CHUMASOV, E.J. (1986). "The effects of serotonin on the morpho-functional development of rat cerebral neocortex in tissue culture". *Brain Res.*, 369, 285-297.
- CHUNG, T.K., FUNK, M.A. y BAKER, D.H. (1990). "L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate as cysteine synthesis in chicks and rats". *J. Nutr.*, 120, 158-165.
- DAKSHINAMURTI, K. (1982). "Neurobiology of pyridoxine". En: "Advances in nutritional research". Ed. H.H. Draper. New York: Plenum Publishing. Vol. 4, pag. 143-179.
- DAKSHINAMURTI, K.B. (1977). "Vitamins and nervous system function". En: "Nutrition and the brain". Ed. R.J. Wurtman y Wurtman. New York. Vol. 1, pag. 249-318.
- DALAL, B.B., CHATTERJEE, A.K. y SADHU, U. (1987). "Impact of amino acid imbalance on brain amines". *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 57, 305-310.
- DALVIT-McPHILLIPS, S.P. (1983). "The effect of the human menstrual cycle on nutrient intake". *Physiol. Behav.*, 31, 209-212.

- DANIEL, P.M., LOVE, E.R. y PRATT, O.E. (1975). "Hypothyroidism and aminoacid entry into brain and muscle". *Lancet*, 2, 872.
- DANIEL, P.M., PRATT, O.E. y WILSON, P.A. (1977). "The exclusion of L-isoleucine or of L-leucine from the brain of the rat, caused by raised levels of L-valine in the circulation, and the manner in which this exclusion can be partially overcome". *J. Neurol. Sci.*, 31, 421-431.
- DANIEL RUDMAN (1989). "Desnutrición proteico-calórica". En: "Principios de la medicina interna". Ed. Interamericana. Eds. T.R. Harrison, E. Braunwald, K.J. Isselbacher, R.G. Petersdorf, J.D. Wilson, J.B. Martin, A.S. Fauci. 7ª edición en español. Vol. 1, cap. 72, pag. 487-492.
- DANIEL, R.G. y WAISMAN, H.A. (1969). "The influence of excess methionine on the free amino acids of brain and liver of the weanling rat". *J. Neurochem.*, 16, 787-795.
- DARMAUN, D., FROGUEL, P., RONGIER, M. y ROBERT, J.J. (1989). "Amino acid exchange between plasma and erythrocytes in vivo in humans". *J. Appl. Physiol.*, 67, 2383-2388.
- DAVID, V.M. y ASHLEY. (1986). "Nutritional control of brain neurotransmitter synthesis and its implications". *Bibliotheca Nutr. Dieta*, 38, 39-53.
- DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATIAUX, P. y APPELEMENTS, F. (1955). "Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue". *Biochemical J.*, 60, 604-606.
- De FEUDIS, F.V. y MANDEL, P. (1981). "Amino acid neurotransmitters". New York. Raven Press. Citado en: RASSIN, D.K. (1987). "Protein nutrition in the neonate: Assessment and implications for brain development". En: "Basic and clinical aspects of nutritional and brain development". Eds. D.K. Rassin, B. Haber y B. Drujan. New York. Vol. 16, pag. 19-39.
- DE PORTUGAL ALVAREZ, J. (1980). "Regulación de la conducta alimentaria". En: "Medicina interna". Paz Montalvo. Ed. A. Schüller Perez. España. Pag. 1084-1090.
- DISCHE, Z. (1930). *Mikrochemie*, 8. Citado en: MARCOS, A. (1982). "Adaptación del metabolismo proteico hepático al stress, en ratas con malnutrición proteica y calórico-proteica". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- D'MELLO, J.P.F. y LEWIS, D. (1978). "Nutritional disorders. Effect of nutrient deficiencies in animals amino acids". En: *CRC handbook series in nutrition and food*. CRC Press, Inc. United States.
- DOBBING, J. (1971). "Undernutrition and the developing brain: the use of animal models to elucidate the human problem". *Psychiatr. Neurol. Neurochir.*, 74, 433-442.
- DONOVAN, S.M., ATILANO, L.C., HINTZ, R.L., WILSON, D.M. y ROSENFELD, R.G.

(1991). "Differential regulation of the insulin-like growth factors (IGF-I and II) and IGF binding proteins during malnutrition in the neonatal rat". *Endocrinology*, 129, 149-157.

- DRAHOTA, Z., HAHN, P., KLEINZELLER, A. y KOSTOLANSKA, A. (1964). "Acetoacetate formation by liver slices from adult and infant rats". *Biochem. J.*, 93, 61-65.

- DREYFUS, P.M. y GEEL, S.E. (1981). "Vitamin and mineral deficiencies". En: "Basic neurochemistry". Boston: Little, Brown. Eds. G.J. Siegel, R.W. Albers, B.W. Agranoff y R. Katzman. 3ª edición. Pag. 661-679.

- DUDEL, J. (1986). "Criteria for identification of transmitter substances". En: "Structure and function of inhibitory neuronal mechanism". Eds. C. Von Euler, S.V. Skoglund y Soderburg. Pergamon Press. Oxford. Pag. 523-525.

- ECKHERT, C., BARNES, R.H. y LEVITSKY, D.A. (1976). "The effect of protein-energy undernutrition induced during the period of suckling on cholinergic enzyme activity in the rat brain stem". *Brain Res.*, 101, 372-377.

- EDWARDS, C.H., GADSDEN, E.L. y EDWARDS, G.A. (1963). "Utilization of methionine by the adult rat. III. Early incorporation of methionine-methyl- C^{14} and methionine 2- C^{14} into rat tissues". *J. Nutr.*, 80, 211-216.

- EKLUND, A. y SJÖBLOM, L. (1986). "Effect of dietary proteins on hepatic and plasma lipoprotein fractions during dietary-induced hypercholesterolemia in male rats". *Biochimica et Biophysica Acta*, 877, 127-134.

- ELIA, M., FOLMER, P., SCHLATMANN, A., GOREN, A. y AUSTIN, S. (1988). "Effect of short-term starvation on the release of glutamine by human muscle". *Proc. Nutr. Soc.*, 17, nº 3, 179A.

- ELWYN, D.H. (1970). "The role of the liver in the regulation of amino acid and protein metabolism". En: "Mammalian protein metabolism". Ed. H.N. Munro. Academic Press. New York. Vol. 4, pag. 523-557.

- ELWYN, D.H., LAUNDER, W.I., PARIKH, H.C. y WISE, E.M. (1972). "Role of plasma and erythrocytes in interorgan transport of aminoacids in dogs". *Am. J. Physiol.*, 222, 1333-1334.

- ENWONWU, C.O. y WORTHINGTON, B.S. (1974). "Concentrations of histidine in brain of guinea pig and rat during protein malnutrition". *Biochem. J.*, 144, 601-603.

- ERECINSKA, M. (1987). "The neurotransmitter amino acid transport systems". *Biochemical Pharmacology*, 36, 21, 3547-3555.

- FAO/WHO. (1973). "Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO Ad. Hoc. Expert Committee". WHO Tech. Rep. Ser., 522. WHO, World Health Organization. Geneva.
- FAO/WHO/UNU. (1985). "Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU. Expert consultation". Tech. Rep. Ser., 724. World Health Organization. Geneva.
- FARBER, E. (1967). "Ethionine fatty liver". En: "Advances in lipid research". Eds. R. Paoletti y D. Kritchvsky. Academic Press. New York. Vol. 5, pag. 119-183.
- FAUS, M.J., GIL, A., ROBLES, R., SANCHEZ-POZO, A., PITA, M.L. y SANCHEZ-MEDINA, F. (1984). "Changes in serum albumin, transferrin and amino acid indices during the first month of life in small-for date infants". Ann. Nutr. Metab., 28, 70-76.
- FAWCETT, J.K. y SCOTT, J.E. (1960). "A rapid and precise method for the determination of urea". J. Clin. Path., 13, 156-159.
- FELIG, P., POZEFSKY, T, MARLISS, E. y CAHILL, G.F. (1970). "Alanine: Key role in gluconeogenesis". J.R. Sci., 167, 1003-1004.
- FELIG, P., WAHREN, J. y RAF, L. (1973). "Evidence of inter-organ amino acid transport by blood cells in humans". Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 1775-1779.
- FELIPO, V., MIÑANA, M.D. y GRISOLIA, S. (1991). "Control of urea synthesis and ammonia utilization in protein deprivation and refeeding". Arch. Biochem. Biophysics, 285, 2, 351-356.
- FERNANDO, J.C.R. y CURZON, G. (1981). "Behavioral responses to drugs releasing 5-hydroxytryptamine and catecholamines: Effects of treatments altering precursor concentrations in brain". Neuropharmacol., 20, 115-122.
- FERNSTROM, J.D. (1983). "Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain". Physiol. Rev., 63, 484-546.
- FERNSTROM, J.D. (1976). "The effect of nutritional factors on brain amino acid levels and monoamine synthesis". Fed. Proc., 35, 1151-1156.
- FERNSTROM, J.D. y FALLER, D.V. (1978). "Neutral aminoacids in brain: Changes in response to food ingestion". J. Neurochem., 30, 1531-1538.
- FERNSTROM, J.D., FALLER, D.V. y SHABSHELOWITZ, H. (1975). "Acute reduction of brain serotonin and 5-HIAA following food consumption: Correlation with the ratio of serum tryptophan to the sum of competing neutral amino acids". J. Neural Transm., 36, 113-121.
- FERNSTROM, J.D., FERNSTROM, M.H. y GRUBB, P.E. (1987). "Twenty-four-hour variations

in rat blood and brain levels of the aromatic and branched-chain aminoacids: Chronic effects of dietary protein content". *Metabolism*, 36, 7, 643-650.

- FERNSTROM, J.D., LARIN, F. y WURTMAN, R.J. (1973). "Correlation between brain tryptophan and plasma neutral amino acid levels following food consumption in rat". *Life Sci.*, 13, 517-524.

- FILLIOS, L.C. y MANN, G.V. (1954). "Influence of sulfur amino acid deficiency on cholesterol metabolism". *Metabolism*, 3, 16-26.

- FISH, I. y WINICK, M. (1969a). "Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain". *Exp. Neurol.*, 25, 534-540.

- FISH y WINICK, M. (1969b). *Pediatr. Res.*, 3, 407.

- FLAKOLL, P.J., KULAYLAT, M., FREXES-STEED, M., HOURANI, U., BROWN, L.L., HILL, J.O. y ABUMRAD, N.N. (1989). "Amino acids augment insulin's suppression of whole body proteolysis". *Am. J. Physiol.*, 257 (Endocrinol. Metabolism, 20), E839-E847.

- FLEISCHER, S.F. y TURKEWITZ, G. (1984). "The use of animals for understanding the effects of malnutrition on human behavior: Models as a comparative approach". En: "Human nutrition, a comprehensive treatise". Plenum Press. New York. Pag. 37-61.

- FLOYD, J.C.Jr., FAJANS, S.S., CONN, J.W., KNOPF, R.F. y RULL, J. (1966). "Stimulation of insulin secretion by amino acids". *J. Clin. Invest.*, 45, 1487-1502.

- FORBES, G.B., DRENICK, E.J. (1979). "Loss of body nitrogen on fasting". *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 1570-1574.

- FRANDO, J.L., SALINAS, M. y WASTERLAIN, C.G. (1980). "Age-dependent changes in brain protein synthesis in the rat". *Neurochem. Res.*, 5, 373-383.

- FRAZER, L.E., WISSLER, R.W., STEFFE, C.H., WOOLRIDGE, R.L. y CANNON, P.R. (1947). "Studies in amino acid utilization. I. The dietary utilization of mixtures of purified amino acids in protein-depleted adult albino rats". *J. Nutr.*, 33, 65-84.

- FREEDMAN, L.S., SAMUELS, S., FISH, I., SCHWARTZ, S.A., LANGE, B., KATZ, M. y MORGANO, L. (1980). "Sparing of the brain in neonatal undernutrition: Amino acid transport and incorporation into brain and muscle". *Science*, 207, 902-904.

- FREXES-STEED, M., WARNER, M.L., BULUS, N., FLAKOLL, P. y ABUMRAD, N.N. (1990). "Role of insulin and branched-chain amino acids in regulating protein metabolism during fasting". *Am. J. Physiol.*, 258 (Endocrinol. Metab., 21), E907-E917.

- FUJITA, Y., ICHIKAWA, M., KURIMOTO, F. y RIKIMARU, T. (1984). "Effects of feed restriction and switching the diet on proteinuria in male Wistar rats". *J. Gerontol.*, 39, 531-537.
- FUKAGAWA, N.K., MINAKER, K.L., ROWE, J.W., GOODMAN, M.N., MATTHEWS, D.E., BIER, O.M. y YOUNG, V.R. (1985). "Insulin-mediated reduction of whole body protein breakdown". *Am. Soc. Clin. Inv.*, 76, 2306-2311.
- FUKAGAWA, N.K., MINAKER, K.L., YOUNG, V.R. y ROWE, J.W. (1986). "Insulin dose-dependent reductions in plasma amino acids in man". *Am. J. Physiol.*, 250, E13-E17.
- FURST, P., ELWYN, D.H., ASKANAZI, J. (1982). "Effect of nutrition and catabolic stress on intra-cellular branched-chain amino acids". En: *Symposia third espen congress*. Eds. Ic. Wesdord y P.B. Soeters. Maastrich, sept. 1981. *Clin. Nutr.*, 81, 10-17.
- GAITONDE, M.K. (1975). "Conversion of U-C¹⁴ into C¹⁴-labeled amino acids in the brain of thiamin-deficient rats". *Biochem. J.*, 150, 285-295.
- GALLER, J.R. y KANIS, K.B. (1987). "Animal models of malnutrition applied to brain research". En: *"Basic and clinical aspects of nutritional and brain development"*. Eds. D.K. Rassin, B. Haber y B. Drujan. New York. Vol. 16.
- GANDY, G., JACOBSON, W. y SIDMAN, R. (1973). "Inhibition of transmetylation reaction in central nervous system: An experimental model for subacute combined degeneration of the cord". *J. Pathol.*, 109, 13-14.
- GANONG, W.F. (1968). "Manual de fisiología médica" (El manual moderno S.A.), 243. Citado en: ORTEGA, R.M. (1981). "Cortisol y algunos parámetros nutricionales en rata: Influencia de la orquidectomía". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- GARLICK, P.J., CLUGSTON, G.A. y WATERLOW, J.C. (1980). "Influence of low-energy diets on whole-body protein turnover in obese subjects". *Am. J. Physiol.*, 238, E235-244.
- GARLICK, P.J., MILLWARD, D.J., JAMES, W.P.T. y WATERLOW, J.C. (1975). "The effect of protein deprivation and stravaion on the rate of protein synthesis in tissues of the rat". *Biochim. Biophys Acta*, 414, 71-84.
- GARROW, J.S., FLETCHER, K. y HALLIDAY, D.J. (1965). "Body composition in severe infantile malnutrition". *J.Clin. Invest.*, 44, 3, 417.
- GAULL, G.E., VON BERG, W., RAIHA, N.C.R. y STURMAN, J.A. (1973). "Development of methyltransferase activity of human fetal tissues". *Pediatr. Res.*, 7, 527-533.

- GAULL, G.E., STURMAN, J.A. y RAIHA, N.C.R. (1972). "Development of mammalian sulfur metabolism: Absence of cystathionase in human fetal tissues". *Pediatr. Res.*, 6, 538-547.
- GELFAND, R.A., MORTON, G., JACOB, R., SHERWIN, R.S. y DE FRONZO, R.A. (1986). "Removal of infused amino acids by splanchnic and leg tissues in humans". *Am. J. Physiol.*, 250, E407-413.
- GESSA, G.L., TAGLIAMONTE, A. (1974). "Der spiegel von freiem tryptophan im serum: Steuerung der konzentrationen von tryptophan im gehirn und der serotonin- synthese". *Ciba Fdn. Symp.*, 22, 207-216.
- GIBSON, C.J. (1985). "Induction of liver tyrosine aminotransferase (TAT) activity by high protein diets but not by tyrosine-supplemented diet". *Can. Fed. Biol. Soc.*, 28, PA132.
- GIBSON, C.J. y WURTMAN, R.J. (1977). "Physiological control of brain catecholamine synthesis by tyrosine concentration". *Biochem. Pharmacol.*, 26, 1137-1142.
- GIRARD, J. (1986). "Gluconeogenesis in late fetal and early neonatal life". *Biol. Neonate*, 50, 237-258.
- GLAESER, B.S., MAHER, T.J. y WURTMAN, R.J. (1983). "Changes in brain levels of acidic, basic, and neutral aminoacids after consumption of single meals containing various proportions of protein". *J. Neurochem.*, 41, 1016-1021.
- GLANVILLE, N.T. y ANDERSON, G.H. (1985). "The effect of insulin deficiency, dietary protein intake, and plasma amino acid concentrations on brain amino acid levels in rats". *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 63, 487-494.
- GLAZENBURG, E.J., JEKEL-HALSEMA, I.M.C., SCHULTENS, E., BAARS, A.J. y MULDER, G.J. (1983). "Effect of variations in the dietary supply of cysteine and methionine on liver concentration of glutathione and active sulfate (PAPS) and serum levels of sulfate, cystine, methionine and taurine: Relation to the metabolism of acetaminophen". *J. Nutr.*, 113, 1363-1373.
- GOLDSPINK, D.F. y KELLY, F.J. (1984). "Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from the foetus to senility". *Biochem. J.*, 217, 507-516.
- GOLDSTEIN, G.W., CSEJTEY, J. y DIAMOND, I. (1977). "Carrier mediated glucose transport in capillaries isolated from rat brain". *J. Neurochem.*, 28, 725-728.
- GONCALVES, C.A., SALBEGO, C., WOFCHUK, S., ROCHA, E. y SOUZA, S.O. (1990). "Effect of undernutrition during suckling on phosphoryl serine levels in nuclear and synaptosomal proteins from cerebral cortex of rats". *J. Nutr.*, 120, 594-597.

- GOODMAN, M.N., LOWELL, B., BELUR, E. y RUDERMAN, N.B. (1984). "Sites of protein conservation and loss during starvation: Influence of adiposity". *Am. J. Physiol.*, 246, E383-E390.
- GOODMAN, M.N., McELANEY, M.A. y RUDERMAN, N.B. (1981). "Adaptation to prolonged starvation in the rat: Curtailment of skeletal muscle proteolysis". *Am. J. Physiol.*, 241, E321-E327.
- GRANTHAM-McGREGOR, S., WALKER, S y POWELL, C. (1991). "Nutritional supplementation and mental development". *The Lancet*, 338, 8769, 758.
- GRAY, A.J. (1982). "Neuropsychology of anxiety". Citado en: LIEBERMAN, H.R. (1986). "Behavioral changes caused by nutrient". *Biblithea Nutr. Dieta*, 38, 219-224.
- GREEN, H., GREENBERG, S.M., ERICKSON, R.W., SAWYER, J.L. y ELLISON, T. (1962). "Effect of dietary phenilalanine and tryptophan upon rat brain amine levels". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 136, 174-178.
- GREENWOOD, C.E. y CRAIG, R.E.A. (1987). "Dietary influences on brain function: Implications during periods of neuronal maturation". En: "Basic and clinical aspects of nutritional and brain development". Eds. D.K. Rassin, B. Haber y B. Drujan. New York. Vol. 16, pag. 159-216.
- GRIFFIN, W.S.T., WOODWARD, A.J. y CHANDRA, R. (1977). "Manutrition and brain development: Cerebral weight DNA, RNA, protein and histological correlations". *J. Neurochem.*, 28, 1269-1279.
- GURNEY, J.M. (1979). "The young child: Protein-energy malnutrition". En: "Human nutrition. II. Nutrition and growth". *Penum Press*. Eds. D.B. Jelliffe y E.F.P. Jelliffe. New York and London. Cap. 9 , pag. 185-212.
- GUSTAFSON, J.M., DODDS, S.J., BURGUS, R.C. y MERCER, L.P. (1986). "Prediction of brain and serum free amino acid profiles in rats fed graded levels of protein". *J. Nutr.*, 116, 1667-1681.
- GUSTAFSON, T. y TONEBY, M. (1970). "On the role of serotonin and acetylcholine in sea archin morphogenesis". *Exp. Cell. Res.*, 62, 102-117.
- HALAS, E.S., WALLWORK, J.C. y SANDSTEAD, H.H. (1982). "Milk zinc deficiency and undernutrition during the prenatal and postnatal periods in rat. Effects on weight, food consumption and brain catecholamine concentrations". *J. Nutr.*, 112, 542-551.
- HAMEL, E., BUTTERWORTH, R.F. y BARBEAU, A. (1979). "Effect of thiamine deficiency on levels of putative amino acid transmitters in regions of the rat brain". *J. Neurochem.*, 33, 575-577.

- HARPER, A.E. (1983). "Dispensable and indispensable amino acid interrelationships". En: "Amino acids-metabolism and medical applications". Eds. G.L. Blackburn, J.P. Grant y V.R. Young. Boston. Pag. 105-122.
- HARPER, A.E. (1974). "Nonessential amino acids". J. Nutr., 104, 965-967.
- HARPER, A.E., BENEVENGA, N.J. y WOHLHUETER, R.M. (1970). "Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids". Physiol. Rev., 50, 428-458.
- HARPER, A.E., LEUNG, P., YOSHIDA, A. y ROGERS, Q.R. (1964). "Some new thoughts on amino acid imbalance". Federation Proc., 23, 1087-1092.
- HARPER, A.E. y PETERS, J.C. (1989). "Protein intake, brain amino acid and serotonin concentrations and protein self-selection". J. Nutr., 119, 677-689.
- HARRIS, J.E. y ROTH, R.H. (1971). "Potassium-induced acceleration of catecholamine biosynthesis in brain slices. A study of the mechanism of action". Mol. Pharmacol., 7, 593-604.
- HAVERBERG, L.N., DECKELBAUM, L., BILMAZES, C., MUNRO, H.N. y YOUNG, V.R. (1975). "Myofibrillar protein turnover and urinary N-methylhistidine output. Response to dietary supply of protein and energy". Biochem. J., 152, 503-510.
- HAWKINS, R.A., y BIEBUYCK, J.F. (1979). "Ketone bodies are selectively used by individual brain regions". Science, 205, 325-327.
- HAWKINS, R.A., WILLIAMSON, D.H. y KREBS, H.A. (1971). "Ketone body utilization by adult and suckling rat brain in vivo". Biochem. J., 122, 13-18.
- HAYDON, P.G., Mc COBB, D.P. y KATER, S.B. (1984). "Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons". Science, 226, 561-564.
- HAYES, K.C., CAREY, R.E. y SCHMIDT, S.Y. (1975). "Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat". Science, 188, 949-951.
- HEARD, C. (1986). "Effects of severe protein-calorie deficiency on the endocrine control of carbohydrate metabolism". Diabetes, 15, 78-89.
- HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". Bri. J. Nutr., 54, 499-508.
- HEGSTED, D.M. (1964). Citado en: "Mammalian protein metabolism". Ed. H.N. Munro. Academic Press. New York. Vol. 2., pag. 135-171.

- HEISE, A. y KRONEBERG, G. (1972). " α -Sympathetic receptor stimulation in the brain and hypotensive activity of α -methyldopa". Eur. J. Pharmacol., 17, 315-317.
- HENCHAW, E.C., HIRSCH, C.A., MORTON, B.E., HIATT, H.H. (1971). "Control of protein synthesis in mammalian tissues through changes in ribosome activity". J. Biol. Chem., 246, 436-466.
- HENRIKSSON, J. (1990). "The possible role of skeletal muscle in the adaptation to periods of energy deficiency". Eur. J. Clin. Nutr., 44, 55-64.
- HENRY, C.J.K., RIVERS, J.P.W. y PAYNE, P.R. (1988). "Protein and energy metabolism in starvation reconsidered". Eur. J. Clin. Nutr., 42, 543-549.
- HILL, F.W. y DANSKY, L.M. (1954). Poultry. Sci., 33, 112.
- HIRSCHFELD, F. (1890). Virchows Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med., 121, 501.
- HOFFENBERG, R., BLACK, E. y BROCK, J.F. (1966). "Albumin and τ -globulin studies in protein depletion states". J. Clin. Invest., 45, 143-152.
- HOMMES, F.A., ELLER, A.G. y TAYLOR, E.H. (1982). "Turnover of the fast components of myelin and myelin proteins in experimental hyperphenylalaninemia". J. Inher. Metab. Dis., 5, 21-27.
- HORIE, Y. y ASHIDA, K. (1973). "Effect of an adequate-protein diet after a low-protein diet on protein catabolism in growing rats". Brit. J. Nutr., 29, 23-31.
- HOSOTANI, T. y YOSHIDA, A. (1974). "Effect of amino acid supplement on liver lipid content and lipid metabolism of rats fed a nonprotein diet". J. Nutr. Sci. Vitaminol., 20, 215-225.
- HOWARD, E. y BUJNOVSZKY, P. (1965). "Effects of corticosterone and food restriction on growth and on DNA, RNA and cholesterol contents of the brain and liver in infant mice". J. Neurochem., 12, 181-191.
- HRBOTICKY, N. (1986). "Effects of tryptophan on mealtime food intake of normal weight men and women". Ph. D. Tesis Doctoral. Universidad de Toronto. Toronto.
- HUANG, Y.S., CUNNAME, S.C. y HORROBIN, D.F. (1986). "Effect of different proteins on plasma and liver fatty acid compositions in growing rats". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 181, 399-403.
- HUETHER, G. (1989). "Amino acid availability and brain development: effects of nutritional and metabolic inadequacies". Euro. J. Clin. Nutr., 43, 19-25.
- HUETHER, G. y REIMER, A. (1987). "Availability of tryptophan and formation of indoleamines

during embryogenesis". En: "Progress in tryptophan and serotonin research". Ed. H. Steinhart. Berlin-New York: Walter de Gruyter and Co. Pag. 237-244.

- HUNTER, W.M. y GREENWOOD, F.C. (1962). "Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity". *Nature*, 194, 495-496.

- ICHIKAWA, M. y FUJITA, Y. (1987). "Effects of nitrogen and energy metabolism on body weight in later life of male Wistar rats consuming a constant amount of food". *J. Nutr.*, 117, 1751-1758.

- IKEDA, M., FAHIEN, L.A. y UDENFRIEND, S. (1966). "A kinetic study of bovine adrenal tyrosine hydroxylase". *J. Biol. Chem.*, 241, 4452-4456.

- INGELBLEEK, Y., De VISSCHER, M. y De NAYER, P. (1972). "Measurement of pre-albumin as an index of protein-calorie malnutrition". *Lancet* ii, 106-108.

- INGELBLEEK, Y., Van Den SCHRIECK, H.G., De NAYER, P. y De VISSCHER, M. (1975). "Albumin, transferrin and the thyroxine-binding pre-albumin/retinol-binding protein (TBRA-RBP) complex in assessment of malnutrition". *Clin. Chim. Acta*, 3, 61-67.

- INOUE, G., FUJITA, Y. y NIYAMA, Y. (1973). "Studies on protein requirements of young men fed egg protein and rice protein with excess and maintenance energy intakes". *J. Nutr.*, 103, 1673-1687.

- ISHIMURA, K., TAKEUCHI, Y., FUJIWARA, K., YOSHIOKA, H., SAWADA, T. y KUSUNOKI, T. (1989). "Effects of undernutrition on the serotonin neuron system in the developing brain: An immunohistochemical study". *Developmental Brain Research*, 50, 225-231.

- JABLONSKI, E. y RAFALSKI, H. (1984). "The utilization of protein from a low-protein diet as determined by limiting essential amino acids". *Brit. J. Nutr.*, 51, 235-243.

- JACKSON, A.A. (1983). "Amino acids: Essential and non-essential?". *Lancet*, 1, 1034-1037.

- JACKSON, A.A., DOHERTY, J., BENOIST, M.H., HIBBERT, J. y PERSAUD, C. (1990). "The effect of the level of dietary protein, carbohydrate and fat on urea kinetics in young children during rapid catch-up weight gain". *Brit. J. Nutr.*, 64, 371-385.

- JACOBSEN, J.G. y SMITH, L.H.Jr. (1968). "Biochemical and physiology of taurine and taurine derivatives". *Physiol. Rev.*, 48, 424-511.

- JAMES, W.P.T., HAY, A.M. (1968). "Albumin metabolism: Effect of the nutritional state and the dietary protein intake". *J. Clin. Invest.*, 47, 1958-1972.

- JAMES, W.P.T. y SHETTY, P.S. (1982). "Metabolic adaptation and energy requirements in

developing countries". *Hum. Nutr. Clin. Nutr.*, 36c, 331-336.

- JASEN, R.G. y MONTE, W.C. (1977). "Amino acid fortification of bread fed at varying levels during gestation and lactation in rat". *J. Nutr.*, 107, 100-309.

- JANSEN, R.G., SCHIBLY, M.B., MASOR, M., SAMPSON y LONGENECKER, J.B. (1986). "Free amino acid levels during lactation in rats: Effects of protein quality and protein quality". *J. Nutr.*, 116, 376-387.

- JELLIFFE, D.B. (1959). "Protein-calorie malnutrition in tropical preschool children". *J. Pediatr.*, 54, 227-256.

- JEPSON, M.M., BATES, P.C. y MILLWARD, D.J. (1988). "The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat". *Brit. J. Nutr.*, 59, 397-415.

- JOH, T.H., PARK, D.H. y REIS, D.J. (1978). "Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase: Mechanism of enzyme activation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4744-4748.

- JOHNSON, R. y BHATTACHARYA, G. (1987). "Statistics: principles and methods". Ed. John. Wiley.

- JOHNSTON, J.L., WARSH, J.J., ANDERSON, G.H. (1983). "Obesity and precursor availability affect urinary catecholamine metabolite production in women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 38, 356-368.

- JONES, J.A., JANSEN, E.J.M., LAAN, C.A., WILLEKES-KOOLSCHIJN, N., KORTLANDT, W. y KOOMANS, H.A. (1988). "Plasma proteins in growing albuminaemic rats fed on a diet of low-protein content". *Brit. J. Nutr.*, 61, 485-494.

- JOLLIFFE, N., TISDALL, F.F. y CANNON, P.R. (1950). *Clin. Nutr.* Citado en: OLOWOKE-RE, J.O. (1987). "The bioenergetics of protein-energy malnutrition syndrome". *Wld. Rev. Nutr. Diet*, 54, 1-25.

- JONES, B.N., PAABO, S. y STEIN, S. (1981). "Amino acid analysis and enzymic sequence determination of peptides by an improved o-phthalaldehyde precolumn labeling procedure". *J. Liquid Chromatography*, 4, 4, 565-568.

- JOST, A. (1966). "Problems of fetal endocrinology: The adrenal glands". *Rec. Prog. Hormone Res.*, 22, 541-569.

- JOST, A. y PICHON, L. (1970). "Hormonal control of fetal development and metabolism". En:

- "Advances in metabolic disorders". Ed. R. Levine y R. Luft. Academic Press. New York. Vol. 4, pag. 123-184.
- JOUVET, M. (1983). "Hypogenic indoleamine-dependent factors and paradoxical sleep rebound". Koella, Sleep, 2-18.
 - JUNG, C.Y. y RAMPAL, A.L. (1977). "Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts". J. Biol. Chem., 252, 5456-5463.
 - JUORIO, A.V. (1987). "Interactions between nutritional satates and some brain biogenic amines". En: "Basic and clinical aspects of nutritional and brain development". Eds. D.K. Rassin, B. Haber y B. Drujan. New York. Vol. 16, pag. 305-313.
 - KADOWAKI, M., NOGUCHI, T. y NAITO, H. (1984). "Regulation of plasma amino acid levels by perfusion of hindquarters of rats". J. Nutr. Sci. Vitaminol., 30, 187-198.
 - KAMMULA, R.G. (1976). "Metabolism of ketone bodies by ovine brain in vivo". Am. J. Physiol., 231, 1490-1494.
 - KANEKO, A. (1979). "Physiology of the retina". Ann. Rev. Neurosci., 2, 169-191.
 - KANG, M.H., MORRIS, J.G. y ROGERS, Q.R. (1987). "Effect of concentration of some dietary amino acids and protein on plasma urea nitrogen concentration in growing kittens". J. Nutr., 117, 1689-1696.
 - KANTAK, K.M., HEGSTRAND, L.R., WHITMAN, J. y EICHELMAN, B. (1980). "Effects of dietary supplements and a tryptophan-free diet on aggressive behavior in rat". Pharmacol. Biochem. Behav., 12, 174-179.
 - KIES, C. (1972). "Nonspecific nitrogen in the nutrition of human beings". Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 31, 1172-1177.
 - KILPATRICK, I.C. y MOZLEY, L.S. (1986). "An initial analysis of the regional distribution of excitatory sulphur-containing amino acids in the rat brain". Neuroscience letters, 72, 189-193. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltr.
 - KINTNER, D., COSTELLO, D.J., LEVIN, A.B. y GILBOE, D.D. (1980). "Brain metabolism after 30 minutes of hypoxic or anoxic perfusion or ischemia". Am. J. Physiol., 239 (Endocrinol. Metab. 2), E501-E509.
 - KIRK, R.D. y WALKER, D.M. (1976). "Plasma urea nitrogen as an indicator of protein quality. II. Relationships between plasma urea nitrogen, various urinary nitrogen constituents, and protein quality". Parte I. Aust. J. Agric. Res., 27, 109.

- KNOPF, R.F., CONN, J.W., FAJANS, S.S., FLOYD, J.C., GUNTSCHE, E.M. y RULL, J.A. (1965). "Plasma growth hormone response to intravenous administration of amino acids". *J. Clin. Endocrinol. (Metab.)*, 25, 1140-1144.
- KNOTT, P.J. y CURZON, G. (1972). "Free tryptophan in plasma and brain tryptophan metabolism". *Nature*, 239, 452-453.
- KOHASHI, N., YAMAGUCHI, K., HOKAWA, Y., KORI, Y., FUJII, O. y UEDA, I. (1978). "Dietary control of cysteine dioxygenase in rat liver". *J. Biochem.*, 84, 159-168.
- KOREVAAR, W.C., GEYER, M.A., KNAPP, S., HSU, L.L. y MANDELL, A.J. (1973). "Regional distribution of 5-methyl-tetrahydrofolic acid in brain". *Nature New Biol.*, 245, 244-245.
- KRAUSE, M.V., MOHER, K.L. (1971). "Food, nutrition and diet therapy". *Textbook of Nutritional Care*, 7th. ed. Philadelphia, Saunders.
- KREBS, H.A. y LUND, P. (1977). "Aspects of the regulation of the metabolism of branched-chain amino acids". *Adv. Enzyme Regul.*, 15, 375-394.
- KRIGMAN, M.R. y HOGAN, E.L. (1976). "Undernutrition in the developing rat: Effect upon myelination". *Brain Res.*, 107, 239-255.
- KRITCHEVSKY, D. (1980). "Age-related changes in lipid metabolism". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 165, 193-199.
- KUMTA, U.S. y HARPER, A.E. (1962). "Amino acid imbalance and balance. IX. Effect of amino acid imbalance on blood amino acid pattern". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 110, 512-517.
- LAJTHA, A., BANAY-SCHWARTZ, M. y GIUFFRIDA, A.M.E. (1987). "Changes in brain protein metabolism with developmental and nutritional state". En: "Basic and clinical aspects of nutritional and brain development". Eds. D.K. Rassin, B. Haber y B. Drujan. New York. Vol. 16, pag. 43-56.
- LAJTHA, A. y DUNLOP, D.S. (1981). "Turnover of protein in the nervous system". *Life Sci.*, 29, 755-767.
- LAJTHA, A. y DUNLOP, D.S. (1976). "Protein metabolism in neuroendocrine tissues". En: "Subcellular mechanisms in reproductive neuroendocrinology". Eds. F. Naftolin, K.J. Ryan y J. Davies. Amsterdam. Elsevier. Pag. 63-80.
- LAJTHA, A.L., MAKER, H.D. y CLARKE, D.D. (1981). "Metabolism and transport of carbohydrate and amino acids". En: "Basic neurochemistry". Ed. Boston: Little, Brown. Ed. G.J. Seigel, R.W. Albers, B.W. Agranoff y R. Katzman. 3ª edición. Pag. 329-353.

- LASLEY, S.M. y THURMOND, J.B. (1985). "Interaction of dietary tryptophan and social isolation on territorial aggression, motor activity, and neurochemistry in mice". *Psychopharmacol.*, 87, 313-321.
- LAUDER, J.M. (1985a). "Hormonal and humoral influences on brain development". *Psychopharmacol.*, 8, 121-155.
- LAUDER, J.M. (1985b). "Roles for neurotransmitter in development: Possible interactions with drugs during the fetal and neonatal periods". *Prog. Clin. Biol. Res.*, 163, 375-380.
- LAUDER, J.M., WALLACE, J.A., KREBS, M., PETRUSZ, P. y McCARTHY, K. (1982). "In vivo and in vitro development of serotonergic neurons". *Brain Res. Bull.*, 9, 605-625.
- LAZZARI, E.P., SULLIVAN, E. y MURRAY, D.R. (1970). "Sensitive colorimetric assay for ribonuclease". *Texas. Rep. Biol. Med.*, 28, 561-564.
- LEATHWOOD, P.D. (1986). "Neurotransmitter precursors and brain function". *Bibltca Nutr. Dieta*, 38, 54-71.
- LEATHWOOD, P.D. y ASHLEY, D.V.M. (1983a). "Strategies of protein selection by weanling and adult rats". *Appetite*, 4, 97-112.
- LEATHWOOD, P.D. y ASHLEY, D.V.M. (1983b). "Behavioural strategies in the regulation of food choice". *Experientia*, 44, 171-196.
- LE FEVRE, P.G. (1972). "Transport of carbohydrate by animal cells". En: "Metabolism Pathways". Ed. L.E. Hokin. Vol. 6. Academic. New York. Pag. 385-454.
- LEHNINGER, A.L. (1972). "Biosíntesis de aminoácidos: Fijación del nitrógeno". En: "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". Omega. Cap. 24, pag. 575-602.
- LEPROHON-GREENWOOD, C.E. y ANDERSON, G.H. (1986). "An overview of the mechanisms by which diet affects brain function". *Food Teach*, 40, 132-138 y 139.
- LEUNG, P. M.B., GAMBLE, M.A. y ROGERS, Q.R. (1981). "Effect of prior protein ingestion on dietary choice of protein and energy in rat". *Nutr. Rep. Int.*, 24, 257-266.
- LEUNG, P.M.B., LASON, D.M. y ROGERS, Q.R. (1986). "Influence of taste on dietary choice of rats fed amino acid imbalanced or deficient diets". *Physiol. Behav.*, 38, 255-264.
- LEUNG, P.M.B. y ROGERS, Q.R. (1971). "Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids". *Am. J. Physiol.*, 221, 929-935.

- LEUNG, P.M.B. y ROGERS, Q.R. (1969). "Food intake: Regulation by plasma amino acid pattern". *Life Sci.*, 8, 1-9.
- LEUNG, P.M.B., ROGERS, Q.R. y HARPER, A.E. (1968). "Effect of amino acid imbalance on plasma and tissue free amino acids in the rat". *J. Nutr.*, 96, 303-318.
- LEVEILLE, G.A. (1972). "Modified thiochrome procedure for the determination of urinary thiamin". *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 273.
- LEVEILLE, G.A., SHOCKLEY, J.W. y SAUBERLICH, H.E. (1962). "Influence of dietary protein level and amino acids on plasma cholesterol of the growing chicks". *J. Nutr.*, 76, 321-324.
- LEVINE, S. y WIENER, S. (1975). "A critical analysis of data on malnutrition and behavioral deficits". *Adv. Pediatr.*, 22, 113-136.
- LEWIS, S.E.M., KELLY, F.J. y GOLDSPIK, D.F. (1984). "Pre- and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow- and fast-twitch skeletal muscle of the rat". *Biochem. J.*, 217, 517-526.
- LI, E.T.S. y ANDERSON, G.H. (1984). "5-Hydroxytryptamine: A modulator of food consumption but not quantity?". *Life Sci.*, 34, 2453-2460.
- LI, E.T.S. y ANDERSON, G.H. (1983). "Amino acids in the regulation of food intake". *Nutr. Abs. Rev. Clin. Nutr.*, 53, 171-181.
- LI, E.T.S. y ANDERSON, G.H. (1982). "Self-selected meal composition, circadian rhythms and meal responses in plasma and brain tryptophan and 5-hydroxytryptamine in rats". *J. Nutr.*, 112, 2001-2010.
- LIEBERMAN, H.R. (1986). "Behavioral changes caused by nutrient". *Bibliotheca Nutr. Dieta*, 38, 219-224.
- LITTLE, J.R., GOTO, M. y SPITZER, J.J. (1970). "Effect of ketones on metabolism of FFA by dog myocardium and skeletal muscle in vivo". *Am. J. Physiol.*, 219, 1458-1463.
- LIU, C.C., CHUNG, C.H. y LEE, M.L. (1973). "Amino acid activation in mammalian brain. Purification and characterization of tryptophan-activating enzyme from buffalo brain". *Biochem. J.*, 135, 367-373.
- LOCKWOOD, E.A. y BAILEY, E. (1971). "The course of ketosis and the activity of key enzymes of ketogenesis and ketone body utilization during development of the postnatal rat". *Biochem. J.*, 124, 249-254.

- LOMBARDINI, J.B., COULTER, A.W. y TALALAY, P. (1970). "Analogues of methionine as substrates and inhibitors of the methionine adenosyltransferase reaction". *Mol. Pharmacol.*, 6, 481-499.
- LONGENECKER, J.B. y HAUSE, N.L. (1959). "Relationship between plasma amino acids and composition of the ingested protein". *Arch. Biochem. Biophys.*, 84, 46-59.
- LOUILLIS, C.C., WAYNER, M.J. y JOLICOEUR, F.G. (1978). "Thalamic taste nuclei lesions and taste aversion". *Physiol. Behav.*, 20, 653-655.
- LOVENBERG, W., JEQUIER, E. y SJOERDSMA, A. (1968). "Tryptophan hydroxylation in mammalian systems". *Adv. Pharmacol.*, 6a, 21-36.
- LOWREY, R.S., POND, W.G., BARNES, R.H., KROOK, L. y LOOSLI, J.K. (1962). *J. Nutr.*, 78, 245.
- LOWRY, O.H. (1952). "Biochemical evidence of nutrition status". *Physiol. Rev.*, 37, 432.
- LOWRY, O.H. y BESSEY, A.O. (1945). "Microbiochemical methods for nutritional studies". *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 4, 268.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). "Protein measurement". *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUBASZEWSKA, S., PASTUSZEWSKA, B. y KIELANOWSKI, J. (1973). "The effect of methionine supplementation of a protein-free diet on the nitrogen excretion in rats and pigs". *Z. Tierphysiol., Tierernährg. U. Futtermittelkunde*, 31, 120-128.
- LUND-ANDERSON, H. (1979). "Transport of glucose from blood to brain". *Physiol. Rev.*, 59, 305-352.
- LUNDGREEN, E. (1977). "Conditions for induction of alkaline phosphatase in cultured human fetal skin fibroblasts". *Exp. Cell. Res.*, 110, 25-30.
- LUNN, P.G. y AUSTIN, S. (1983). "Excess energy intake promotes the development of hypoalbuminaemia in rats fed on low protein diets". *Brit. J. Nutr.*, 49, 9-16.
- LUNN, P.G., WHITEHEAD, R.G., BAKER, B.A. y AUSTIN, B. (1976). "The effect of cortisone acetate on the course of development experimental PEM in rats". *Brit. J. Nutr.*, 36, 537-542.
- LUNN, P.G., WHITEHEAD, R.G., HAY, R.W. y BAKER, B.A. (1973). "Progressive changes in serum cortisol, insulin and growth hormone concentrations and their relationship to the distorted amino acid pattern during the development of kwashiorkor". *J. Nutr.*, 29, 399.

- LUTZ, J., TEWS, J.K. y HARPER, A.E. (1975). "Simulated amino acid imbalance and histidine transport in rat brain slices". *Am. J. Physiol.*, 229, 229-234.
- LYTLE, L.D., MESSING, R.B., FISHER, L.A., PHEBUS, L. (1975). "Effects of long-term corn consumption on brain serotonin and the response to electric shock". *Science*, 190, 692-694.
- MacDONALD, I. (1990). "Non-linear relationship between reduced energy intake and rate of weight loss in rats". *Ann. Nutr. Metab.*, 34, 213-215.
- MADRAS, B.K., COHEN, E.L., MESSING, R., MUNRO, H.N. y WURTMAN, R.J. (1974a). "Relevance of free tryptophan in serum to tissue tryptophan concentrations". *Metabolism*, 23, 1107-1116.
- MADRAS, B.K., COHEN, E.L., MUNRO, H.N. y WURTMAN, R.J. (1974b). "Elevation of serum free tryptophan but not brain tryptophan, by serum non-esterified fatty acids". *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 11, 143-151.
- MAES, M., MAITER, D., THISSEN, J.P., UNDERWOOD, L.E. y KETELSLEGERS, J.M. (1991). "Contributions of growth hormone receptor and postreceptor defects to growth hormone resistance in malnutrition". *Trends Endocrinol. Metab.*, 2, 3, 92-97.
- MAHER, T.J. y WURTMAN, R.J. (1980). "L-Theonine administration increases glycine concentrations in the rat central nervous system". *Life Sci.*, 26, 1283-1286.
- MAK, R.H.K., TURNER, C., THOMPSON, T., HAYCOCK, G. y CHATLER, C. (1986). "The effect of a low protein diet with amino acid/ceto acid supplements on glucose metabolism in children with uremia". *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 63, 4, 985-989.
- MANDELL, A.J. (1978). "Redundant mechanisms regulating tyrosine and tryptophan hydroxylases". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 18, 461-493.
- MANS, A.M., BIEBUYCK, J.F. y HAWKINS, R.A. (1980). "Decreased influx of β -hydroxybutyrate into various brain structures after portacaval anastomosis". *Soc. Neurosci. Abstr.*, 6, 768.
- MANS, A.M., BIEBUYCK, J.F., SHELLY, K y HAWKINS, R.A. (1982). "Regional blood-brain barrier permeability to amino acids after portacaval anastomosis". *J. Neurochem.*, 38, 705-717.
- MARCOS, A. (1982). "Adaptacion del metabolismo proteico hepático al stress, en ratas con malnutrición proteica y proteico-calórica". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.

- MARCHBANKS, R.M. (1966). "Serotonin binding to nerve ending particles and other preparations from rat brain". *J. Neurochem.*, 13, 1481-1493.
- MARTINEZ, J.A., ROSS, A.C. y BUTTERY, P.J. (1987). "Effect of a methionine free diet on muscle protein synthesis". Citado en: MARTINEZ, J.A., GOEMA, M., SANTIDRIAN, S. y LARRALDE, J. (1987). "Response of muscle liver and whole body protein turnover to two different sources of protein in growing rats". *Ann. Nutr. Metab.*, 31, 146-153.
- MASSERRANO, J.M. y WEINER, N. (1983). "Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system". *Mol. Cell. Biochem.*, 53-54, 129-152.
- MATHESON, D.F., OEI, R. y ROOTS, B.I. (1981). "Effect of dietary lipid on the acyl group composition of glycerophospholipids of brain endothelial cells in the developing rat". *J. Neurochem.*, 36, 2073-2079.
- MATSUMOTO, H., ITO, M., KIKUCHI, S. y EDAMURA, M. (1985). "Age-related changes of glucose metabolism in rat cerebral cortex with reference to glucose derived amino acids". *Neurochemical Research*, 10, 12, 1615-1622.
- MAYER, M., SHAFRIR, E., KAISER, N., MILHOLLAND, R.J. y ROSEN, F. (1976). "Interaction of glucocorticoid hormones with rat skeletal muscle. Catabolic effects and hormone binding". *Metabolism*, 25, 157-167.
- MAZZAFERRI, E.L., CIOFALO, L., WATERS, L.A., STARICH, G.H., GROSHONG, J.C. y DE PALMA, L. (1983). "Effect of gastric inhibitory polypeptide on leucine- and arginine-stimulated insulin release". *Am. J. Physiol.*, 245 (Endocrinol. Metab., 8), E114-E120.
- Mc CANCE y WIDDOWSON. (1962). *Proc. R. Soc. Lond.*, 156, 326.
- Mc DONALD, R.B. (1990). "Effect of age and diet on glucose tolerance in sprague-Dawley rats". *J. Nutr.*, 120, 598-601.
- Mc DONALD, M.R. (1955). En: "Methods in enzymology". Eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan. Academic Press. New York. Vol. 2, pag. 437-447.
- Mc DONALD, I., HANSEN, J.D.L. y BRONTE-STEWART, B. (1963). "Liver depot and serum during early recovery from kwashiorkor". *Clin. Sci.*, 24, 55-61.
- Mc GARRY, J.D. y FOSTER, D.W. (1980). *Annual Reviews in Biochemistry*, 49, 395-420. Citado en: WILLIAMSON, D.H. (1987). "Brain substrates and the effects of nutrition". *Proceeding of the Nutrition Society*, 46, 81-87.

- McGEER, E.G., FIBIGER, H.C. y WICKSON, V. (1971). "Differential development of caudate enzymes in the neonatal rat". *Brain Res.*, 32, 433-440.
- Mc KEAN, C.M., BOGGS, D.E. y PETERSON, N.A. (1968). "The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentrations of essential amino acids in brain". *J. Neurochem.*, 15, 235-241.
- Mc LAREN, D.S. (1966). "A fresh look at protein-calorie malnutrition". *Lancet* ii, 485-488.
- Mc MENAMY, R.H. (1965). "Binding of indole analogues to human serum albumin". *J. Biol. Chem.*, 240, 4235-4243.
- Mc MENAMY, R.H., ONCLEY, J.L. (1958). "The specific binding of L-tryptophan to serum albumin". *J. Biol. Chem.*, 233, 1436-1447.
- MEHTA, S., RELAN, N.K. y NAIN, C.K. (1981). "Biochemical composition of brain in young Rhesus monkey with protein calorie malnutrition". *Indian J. Exp. Biol.*, 19, 238-240.
- MELAMED, E., HEFTI, F. y WURTMAN, R.J. (1980). "Tyrosine administration increases strial dopamine release in rat with partial nigrostriatal lesions". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4305-4309.
- MELIZA, L.L., LEUNG, P.M.B. y ROGERS, Q.R. (1983). "Cingulate lesions and behavioral adaptation to amino acid imbalanced diets". *Physiol. Behav.*, 30, 243-246.
- MELIZA, L.L., LEUNG, P.M.B. y ROGERS, Q.R. (1981). "Effect of anterior prepyriform and medial amygdaloid lesions on acquisition of taste avoidance and response to dietary amino acid imbalance". *Physiol. Behav.*, 26, 1031-1035.
- MERCER, L.P., DODDS, S.J., SCHWEISTHAL, M.R. y DUNN, J.D. (1989). "Brain histidine and food intake in rats fed diets deficient in single amino acids". *J. Nutr.*, 119, 66-74.
- MEREI, F.T. y GALLYAS, F. (1964). "Quantitative determination of the uptake of (S^{35})methionine in different regions of the normal rat brain". *J. Neurochem.*, 11, 257-264.
- MERTZ, E.T. (1972). "The protein and amino acid needs". En: "Fish nutrition". Ed. J.E. Halver. Academic Press. New York. Pag. 105-143.
- MEYER, J.H. y HARGUS, W.A. (1959). "Factors influencing food intake of rats fed low protein rations". *Am. J. Physiol.*, 197, 1350-1352.
- MILLER, A.L., HAWKINS, R.A. y VEECH, R.L. (1973). "The mitochondrial redox state of rat brain". *J. Neurochem.*, 20, 1393-1400.

- MILLER, M., LEAHY, J.P., Mc CONVILLE, F., MORGANE, P.J. y RESNICK, O. (1977). "Phenylalanine utilization in brain and peripheral tissues during development in normal and protein malnourished rats". *Brain Res. Bull.*, 2, 289-195.
- MILLER, D.S. y PAYNE, P.R. (1961). "Problems in the predictions of protein values of diets. The influence of protein concentration". *Brit. J. Nutr.*, 15, 11-19.
- MILLWARD, D.J., GARLICK, P.J., STEWART, R.J.C., NNANYELUGO, D.O. y WATERLOW, J.C. (1975). "Skeletal muscle growth and protein turnover". *Biochem. J.*, 150, 235-243.
- MILLWARD, D.J. y RIVERS, J.P.W. (1988). "The nutritional role of indispensable amino acids and the metabolic basis for their requirements". *Europ. J. Clin. Nutr.*, 42, 367-393.
- MILLWARD, D.J. y WATERLOW, J.C. (1978). "Effect of nutrition on protein turnover in skeletal muscle". *Fed. Proc.*, 37, 2283-2290.
- MITCHELL. (1923). *J. Biol. Chem.*, 58, 873. Citado en: HAMISH, N.M. y MARILYN, C.C. "The protein and amino acids". En: "Modern nutrition in health and disease". Lea and Febiger. Eds. R.S. Goodhard y M.E. Shils. (1980). 6ª edición. Philadelphia. Cap. 3, pag. 51-98.
- MOLLER, S.E. (1986). "Plasma neutral amino acids and food preferences: Possible implications in normals and depressives". *Biblhca Nutr. Dieta*, 38, 149-153.
- MOLLER, S.E. (1985). "Effect of various oral protein doses on plasma neutral amino acid levels". *J. Neural Transm.*, 61, 183-191.
- MONTOYA, A., GOMEZ-LECHON, M.J. y CASTELL, J.V. (1987). "Influence of branched-chain amino acids on the synthesis of plasma proteins by cultured rat hepatocytes". *J. Clin. Nutr. Gastroenterol.*, 2, 117-125.
- MOORE, T.J., LIONE, A.P., SUGDEN, M.C. y REGEN, D.M. (1976). "β-hydroxybutyrate transport in rat brain: Developmental and dietary modulations". *Am. J. Physiol.*, 230, 619-630.
- MOORE, B.W., MENKE, R., PRENSKY, A.L., FISHMAN, M.A. y AGRAWAL, H.C. (1977). "Selective decreases of S-100 in discrete anatomical areas of undernourished rat brain". *Neurochem. Res.*, 2, 549-553.
- MORGAN, R.F. y O'DELL, B.L. (1977). "Effect of copper deficiency on the concentrations of catecholamines and related brain activities". *J. Neurochem.*, 28, 207-213.
- MORRIS, J.P.F. (1987). "Early dietary experience and subsequent protein selection in the rat". Ph.D. Tesis Doctoral. Universidad de Toronto. Toronto. Pag. 107-127.

- MORRIS, T.R. (1983). En: "Recent advances in animal nutrition". Ed. W. Haresign. London: Butterworths. Pag. 13-24. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Bri. J. Nutr.*, 54, 499-508.
- MORRISON, A.B. (1964). "Caloric intake and nitrogen utilization". *Fed. Proc.*, 23, 1083-1086.
- MORRISON, A.B. (1963). "Evaluation of protein in foods. X. Effects of source and concentration of dietary fat on protein efficiency". *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 46, 909.
- MORRISON, A.B. y NARAYANA RAO, O.M. (1967). "Some relationships between protein and calories". *Wld. Rev. Nutr. Diet*, 7, 204-224.
- MOUREK, J., AGRAWAL, H.C., DAVIS, J.M. y HIMWICH, W.A. (1970). "The effects of short-term starvation on amino acid content in rat brain during ontogeny". *Brain Res.*, 19, 229-237.
- MUNRO, H.N. (1970). "Free amino acid pools and their role in regulation". En: "Mammalian protein metabolism". Ed. H.N. Munro y J.B. Allison. Academic Press. New York. Vol. 4, cap. 34, pag. 299-386.
- MUNRO, H.N. (1951). "Carbohydrate and fat as factors in protein utilization". *Physiol. Rev.*, 31, 449-488.
- MURAMATSU, K. (1984). "Amino acid toxicity and its nutritional control in the rat". *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 37, 399-418.
- MURILLO, M.P., VALENTE, G.B., TASCA, C.I., ATTOS, A.G. y PESSOA PUREUR, R. (1991). "Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex". *J. Nutr.*, 121, 1349-1354.
- MUSTEN, B., PEACE, D. y ANDERSON, G.H. (1974). "Food intake regulation in the weanling rat: Self-selection of protein and energy". *J. Nutr.*, 104, 563-572.
- NAGATSU, T., LEVITT, M. y UDENFRIEND, S. (1964). "Tyrosine hydroxylase: The initial step in norepinephrine biosynthesis". *J. Biol. Chem.*, 239, 2910-2917.
- NAKAHARA, T., HIRANO, M., MATSUMOTO, T., KUROKI, T., TATEBAYASHI, Y., TSUTSUMI, T., NISHIYAMA, K., OOBOSHI, H., NAKAMURA, K., YAO, H., SHIRAISHI, A., WAKI, M. y UCHIMURA, H. (1990). "Regional distribution of DNA and RNA in rat brain: A sensitive determination using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". *Neurochemical Research*, 15, 6, 609-611.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. (1978). "Nutritional evaluation of food". Washington.

Citado en: HAMISH, N.M. y MARILYN, C.C. "The protein and amino acids". En: "Modern nutrition in health and disease". Lea and Febiger. Eds. R.S. Goodhard y M.E. Shils. (1980). 6ª edición. Philadelphia. Cap. 3, pag. 51-98.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978). "Nutrient requirements of the laboratory rat". Natural Academy of Science. Washington. Pag. 13-26.

- NAUGHTON, J.M. (1981). "Supply of polyenoic fatty acids to the mammalian brain: The ease of conversion of the short-chain essential fatty acids to their longer chain polyunsaturated metabolites in liver, brain, placenta and blood". *Int. J. Biochem.*, 13, 21-32.

- NEAL, M.J. (1971). "The uptake of C¹⁴-glicina by slices of mammalian spinal cord". *J. Physiol.*, 215, 103-117.

- NEUHÄUSER, M, GRÖTZ, K.A., WANDIRA, J.A., BÄSSLER, K.H. y LANGER, K. (1986). "Utilization of methionine and N-acetyl-L-cysteine during long-term parenteral nutrition in the growing rat". *Metabolism*, 35, 869-873.

- NICOLL, R.A., MALENKA, R.C. y KAUER, J.A. (1990). "Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system". *Physiol. Rev.*, 70, 2, 513-565.

- NISHIZAWA, N. (1983). "Development and its application of a method to estimate catabolic rate of miofibrillar protein by measuring urinary escretion of N-methylhistidine". *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. (Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi)*, 36, 409-423.

- NODA, K. y CHIKAMORI, D. (1976). "Effect of ammonia via prepyriform cortex on regulation of food intake in the rat". *Am. J. Physiol.*, 231, 1263-1266.

- NOMANI, M.Z.A., HALLAK, M.H., NOMANI, S. y SIDDIQUI, I.P. (1989). "Changes in blood urea and glucose and their association with energy-containing nutrients in men on hypocaloric diets during Ramadan fasting". *Am. J. Clin. Nutr.*, 49, 1141-1145.

- OKITOLONGA, W., BRICHARD, S.M. y HENQUIN, J.C. (1987). "Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat". *Diabetologia*, 30, 946-951.

- OLDENDORF, W.H. (1971). "Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection". *Am. J. Physiol.*, 221, 1629-1639.

- OLDENDORF, W.H. (1970). "Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard". *Brain Res.*, 24, 372-376.

- OLDENDORF, W.H. y SZABO, J. (1976). "Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers". *Am. J. Physiol.*, 230, 94-98.
- OLNEY, J.W. y HO, O.L. (1970). "Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine". *Nature*, 227, 609-610.
- OLNEY, J.W., HO, O.L., RHEE, V. y SCHAIKER, B. (1972). "Cysteine-induced brain damage in infant and fetal rodents". *Brain Res.*, 45, 309-313.
- OLOWOOKERE, J.O. (1987). "The bioenergetics of protein-energy malnutrition syndrome". *Wld. Rev. Nutr. Diet*, 54, 1-25.
- OLSON, L. y SEIGER, A. (1972). "Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: Fluorescence histochemical observations". *Z. Anat. Entwickl-Gesch*, 137, 301-316.
- ORDONEZ, L.A. (1977). "Control of the availability to the brain of folic acid, vitamin B₁₂ and choline". En: "Nutrition and the brain". Ed. R.J. Wurtman y J.J. Wurtman. Raven Press. New York. Vol. 1, pag. 205-248.
- OSBORNE, T.B. y MENDEL, L.B. (1918). "The choice between adequate and inadequate diets, as made by rats". *J. Biol. Chem.*, 35, 19-27.
- OUSTERHOUT, L.E. (1960). *J. Nutr.*, 70, 226-232. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Br. J. Nutr.*, 54, 499-508.
- OVERMAN, S.R. (1976). "Dietary self-selection by animals". *Psychol Bull.*, 83, 218-235.
- OWEN, O.E., MORGAN, A.P., KEMP, H.G., SULLIVA, J.M., HERRERA, M.G. y CAHILL, G.F. (1967). "Brain metabolism during fasting". *J. Clin. Invest.*, 46, 1589-1595.
- OWEN, O.E. y ROBINSON, R.R. (1963). "Amino acid extraction and ammonia metabolism by the human kidney during prolonged administration of ammonium chloride". *J. Clin. Invest.*, 42, 263-276.
- PADRO, J.B., SCHWARTZ, S., FARROIL, M. y SERRA, J. (1984). "Niveles plasmáticos de aminoácidos ramificados (AAR) en la agresión. Efecto nutriente". *Nutr. Clin.*, 3, 42-51.
- PAGE, M.A., KREBS, H.A. y WILLIAMSON, D.H. (1971). *Biochem. J.*, 121, 49-53. Citado en: WILLIAMSON, D.H. (1987). "Brain substrates and the effects of nutrition". *Proceeding of the Nutrition Society*, 46, 81-87.

- PAGE, M.A. y WILLIAMSON, D.H. (1971). *Lancet* ii, 66-68. Citado en: WILLIAMSON, D.H. (1987). "Brain substrates and the effects of nutrition". *Proceeding of the Nutrition Society*, 46, 81-87.
- PALMER, S. (1990). "Recommended dietary allowances, tenth edition". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 44, suppl. 2, 13-21.
- PARDRIDGE, W.M. (1983). "Brain metabolism: A perspective from the blood-brain barrier". *Physiol. Rev.*, 63, 4, 1481-1535.
- PARDRIDGE, W.M. (1977a). "Regulation of amino acid availability to the brain". En: "Nutrition and the brain". Eds. Wurtman, Wurtman. Raven Press. New York. Vol. 1, pag. 141-204.
- PARDRIDGE, W.M. (1977b). "Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier". *J. Neurochem.*, 28, 103-108.
- PARDRIDGE, W.M., CRANE, P.D., MIETUS, L.J. y OLDENDORF, W.H. (1982). "Kinetics of regional blood-brain barrier transport and brain phosphorylation of glucose and 2-deoxyglucose in the barbiturate-anesthetized rat". *J. Neurochem.*, 38, 560-568.
- PARDRIDGE, W.M. y CHOI, T.B. (1986). "Neural amino acid transport at the human blood-brain barrier". *Fed. Proc.*, 45, 2073-2078.
- PARDRIDGE, W.M., FRANK, H.J.L., CORNFORD, E.M., BRAUN, L.D., CRANE, P.D. y OLDENDORF, W.H. (1981). "Neuropeptides and the blood brain barrier". En: "Neurosecretion and brain peptides". Eds. J.B. Martin, S. Reichlin y K.L. Bick. Raven. New York. Pag. 321-328.
- PARKS, J.M., AMES III, A. y NESBETT, F.B. (1976). "Protein synthesis in central nervous tissue: Studies on retina in vitro". *J. Neurochem.*, 27, 987-997.
- PASANTES-MORALES, H., LOPEZ ESCALERA, R. y MORAN, J. (1987). "Taurine and zinc in nutrition and cellular development". En: "Basic and clinical aspects of nutritional and brain development". Eds. D.K. Rassin, B. Haber y B. Drujan. New York. Vol. 16.
- PASCAUD, M. y Ng, L.T. (1990). "Plasma and tissue-free amino acids in the developing chick". *Ann. Nutr. Metab.*, 34, 198-207.
- PASMORE, R., EASTWOOD, M.A. (1986). "Protein-energy malnutrition". En: "Human nutrition and dietetics". Churchill Livingstone. Edinburg, London, Melbourne and New York. Cap. 29, pag. 279-291.
- PATEL, A.J., ATKINSON, D.J. y BALAZS, R. (1975b). "Effect of undernutrition on metabolic compartmentation of glutamate and on the incorporation of C¹⁴-leucine into protein in the developing rat brain". *Dev. Psychobiol.*, 8, 453-464.

- PATEL, A.J., BALAZS, R. y JOHNSON, A.L. (1973). "Effect of undernutrition on cell formation in the rat brain". *J. Neurochem.*, 20, 1151-1165.
- PATEL, A.J., Del VECCHIO, M. y ATKINSON, D.J. (1978). "Effect of undernutrition on the regional development of transmitter enzymes: Glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase". *Dev. Neurosci.*, 1, 41-53.
- PATEL, M.S., JOHNSON, C.A., RAJAN, R. y OWEN, O.E. (1975a). *J. Neurochem.*, 25, 905-908. Citado en: WILLIAMSON, D.H. (1987). "Brain substrates and the effects of nutrition". *Proceeding of the Nutrition Society*, 46, 81-87.
- PAYNE-ROBINSON, H.M., COORE, H.G., GOLDEN, M.H.N. y SIMEON, D.T. (1990). "Changes in red cell insulin receptors during recovery from severe malnutrition". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 44, 803-812.
- PENG, Y., BENEVENGA, N.J. y HARPER, A.E. (1969). "Amino acid balance and food intake: Effect of previous diet on plasma amino acids". *Am. J. Physiol.*, 216, 1020-1025.
- PENG, Y., GUBIN, J., HARPER, A.E., VAVICH, M.G. y KEMMERER, A.R. (1973). "Food intake regulation: Amino acid toxicity and changes in rat brain and plasma amino acids". *J. Nutr.*, 103, 608-617.
- PENG, Y.S., MELIZA, L.L., VAVICH, M.G. y KEMMERER, A.R. (1974). "Changes in food intake and nitrogen metabolism of rats while adapting to a low or high protein diet". *J. Nutr.*, 104, 1008-1017.
- PENG, Y., TEWS, J.K. y HARPER, A.E. (1972). "Amino acid imbalance protein intake, and changes in rat brain and plasma amino acids". *Am. J. Physiol.*, 222, 314-321.
- PENNISI, A.J., WANG, M., KOPPLE, J.D. (1976). "Effects of low nitrogen diets in uremic and control rats". *Fed. Proc.*, 35, 257 (abstr.).
- PERLSTEIN, R., KOPP, L. y TUCCI, J.R. (1977). *Acta Endocrinol.*, 84, 343. Citado en: ORTEGA, R.M. (1981). "Cortisol y algunos parámetros nutricionales en rata: Influencia de la orquidectomía". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- PERRY, M.L.S., GAMALLO, J.L.G. y BERNARD, E. (1986). "Effect of protein malnutrition on glycoprotein synthesis in rat cerebral cortex slices during the period of brain growth spurt". *J. Nutr.*, 116, 2486-2489.
- PETERS, J.C. (1983). "Biochemical and neurochemical studies on the control of protein intake by the rat". Ph. D. dissertation, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI.

- PETERS, J.C. y HARPER, A.E. (1987). "Acute effects of dietary protein on food intake, tissue amino acids, and brain serotonin". *Am. J. Physiol.*, 252, R902-R914.
- PETERS, J.C. y HARPER, A.E. (1985). "Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: Effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism". *J. Nutr.*, 115, 382-398.
- PETERS, J.C. y HARPER, A.E. (1981). "Protein and energy consumption, plasma amino acid ratios, and brain neurotransmitter concentrations". *Physiol. Behav.*, 27, 287-298.
- PETERS, J.C., NEMETZ, D.J., TEWS, J.K. y HARPER, A.E. (1983). "Relationships among plasma and brain amino acid patterns and protein intake". *Nutr. Rep. Int.*, 27, 407-419.
- PFEIFFER, C.C. y BRAVERMAN, E.R. (1982). "Zinc, the brain and behavior". *Biol. Psychiatry*, 17, 513-532.
- PLATT, B.S., HEARD, C.R.C. y STEWART, R.J.C. (1964). En: "Mammalian protein metabolism". Eds. H.N. Munro y J.B. Allison. Academic Press. New York. Pag. 446.
- POPPER, H. (1937). "Creatinine determination in blood". *Biochem. Z.*, 291, 354-367.
- PORTMAN, O.W., ALEXANDER, M., NEURINGER, M., NEVY, M., ILLINGWORTH, R. y UNO, H. (1977). "Effects of perinatal malnutrition on lipid composition of neural tissues from Rhesus monkeys". *J. Nutr.*, 2228-2235.
- PORTMAN, O.W., NEURINGER, M. y ALEXANDER, M. (1987). "Effect of maternal and long-term postnatal protein malnutrition on brain size and composition in rhesus monkeys". *J. Nutr.*, 117, 1844-1851.
- PRATT, O.E. (1980). "The transport of nutrients into the brain: The effect of alcohol on their supply and utilization". En: "Addiction and brain damage". Ed. D. Richter. University Park Press, Baltimore. Pag. 94-128.
- PUGLIESE, M.T. (1990). "Endocrine function adaptations in undernutrition". *World Rev. Nutr. Diet*, 62, 186-211.
- RAMANAMURTHY, R.S.V. y SRIKANTIA, S.G. (1970). "Effects of leucine on brain serotonin". *J. Neurochem.*, 17, 27-32.
- RANA, S.V. y MEHTA, S. (1991). "Effect of protein calorie malnutrition on in vitro incorporation of (U-¹⁴C)-glucose in brain of young rhesus monkeys". *Indian J. Exp. Biol.*, 29, 259-262.

- RANG, H.P., RITCHIE, J.M. (1968). "The dependence on external cations of the oxygen consumption of mammalian nonmyelinated nerve fibers at rest and during activity". *J. Physiol. (Lond.)*, 196, 163-181.
- RAO, K.S.J. (1974). "Evolution of Kwashiorkor and Marasmus". *Lancet* i, 1, 7860, 709.
- RASSIN, D.K. (1987). "Protein nutrition in the neonate: Assessment and implications for brain development". En: "Basic and clinical aspects of nutritional and brain development". Eds. D.K. Rassin, B. Haber y B. Drujan. New York. Vol. 16, pag. 19-39.
- REDDY, M.K., ETLINGER, J.D., RABINOWITZ, M., FISCHMAN, D.A. y ZAK, R.J. (1975). "Removal of z-line and α -actinin from isolated myofibrils by calcium-activated neutral protease". *Biol. Chem.*, 250, 4278-4284.
- REEVES, P.G. y O'DELL, B.L. (1981). "Short-term zinc deficiency in the rat and self-selection of dietary protein levels". *J. Nutr.*, 111, 375-383.
- REITH, M.E.A., SCHOTMAN, P., VAN ZWIETEN, B.J. y GISPEN, W.H. (1979). "The nature of the amino acid pool used for protein synthesis in rat brain slices". *J. Neurochem.*, 32, 413-420.
- REITMANN, S. y FRANKEL, S. (1957). "Determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases". *Am. J. Clin. Path.*, 28, 56-63.
- RIKIMARU, T., ICHIKAWA, M., OOZEKI, T., EBISAWA, H. y FUJITA, Y. (1988). "Long-term effect of energy restriction at different protein levels on several parameters of nutritional assessment". *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 34, 469-480.
- RIKIMARU, T., OOZEKI, T., ICHIKAWA, M., EBISAWA, H. y FUJITA, Y. (1989). "Comparisons of urinary creatinine, skeletal muscle mass, and indices of muscle protein catabolism in rats fed ad libitum, with restricted food intake, and deprived of food". *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35, 199-209.
- RIKIMARU, T., YAMAMOTO, S., MAEDA, K. y INOUE, G. (1978). "Effect of nutrition in protein turnover of adult rats". *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 26, 39-57.
- ROBERTS, S. (1965). "Influence of elevated circulating levels of amino acids on cerebral concentrations and utilization of amino acids". *Prog. Brain Res.*, 29, 235-243.
- ROBINSON, A.M. y WILLIAMSON, D.H. (1980). *Physiological Reviews*, 60, 143-187. Citado en: WILLIAMSON, D.H. (1987). "Brain substrates and the effects of nutrition". *Proceeding of the Nutrition Society*, 46, 81-87.

- ROCHA, D.M., FALOONA, G.R. y UNGER, R.H. (1972). "Glucagon-stimulating activity of 20 amino acids in dogs". *J. Clin. Invest.*, 51, 2346-2351.
- RODRIGUEZ SANABRIA, F. (1983). "Desarrollo psíquico y malnutrición proteica. Evolución sensoriomotriz y capacidad de aprendizaje". Proyecto CAICYT n° ref. 3875/79. Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- ROGERS, D.J. (1959). "Cassava leaf protein". *Econ. Bot.*, 13, 261-263.
- ROGERS, Q.R. y LEUNG, P.M.B. (1973). "The influence of amino acids on the neuroregulation of food intake". *Fed. Proc.*, 32, 1709-1719.
- ROSCHLAU, P., BERNT, E. y GRUBER, W. (1975). 9Th. Int. Congr. of Clin. Chemistry. Toronto. Abst. n° 1.
- ROSE (1938). *Physiol.Rev.*, 18, 109.
- ROSE, W.C., COON, M.J., LOCKHART, H.B. y LAMBERT, G.F. (1955). "The amino acid requirement of man. XI. The threonine and methionine requirements". *J. Biol. Chem.*, 215, 101-110.
- ROSE, W.C. y WIXOM, R.L. (1955). "The amino acid requirements of man. XIII. The sparing effect of cystine on the methionine requirement". *J. Biol. Chem.*, 216, 763-773.
- ROSENTHAL, H.L. y ALLISON, J.B. (1956). *J. Agr. Fd. Chem.*, 4, 792; (1951). *J.Nutr.*, 44, 423. Citado en: MORRISON, A.B. y NARAYANA RAO, O.M. (1967). "Some relationships between protein and calories". *Wld. Rev. Nutr. Diet*, 7, 204-224.
- ROSLYN, B., ALFIN-SLATER y ROSE MIRENDA (1980). "Nutrition adult". En: "Human nutrition". Penum Press. Eds. B. Roslyn, Alfin-Slater y David Kritchevsky. London and New York. Pag. 1-37.
- ROTH, R.H., SALZMAN, P.M. y NOWYCKY, M. (1978). "Impulse flow and short term regulation of transmitter biosynthesis in central catecholaminergic neurons". En: "Psychopharmacology: A generation of progress". Ed. M.A. Lipton, A. Di Mascio y K.F. Killam. Raven Press. New York. Pag. 185-198.
- RUDERMAN, N.B., ROSS, P.S., BERGER, M. y GOODMAN, M.N. (1974). "Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anaesthetized rats". *Biochem. J.*, 138, 1-10.
- RUDY, J.W. y CASTRO, C.A. (1990). "Undernutrition during the brain growth period of the rat significantly delays the development of processes mediating Pavlovian Trace Conditioning". *Behavioral and Neural Biology*, 53, 307-320.

- SAID, A.K. y HEGSTED, D.M. (1970). "Evaluation of dietary protein quality in adult rats". *J. Nutr.*, 100, 1363-1373.
- SAMAREL, A.M., OGUNRO, E.A., FERGUSON, A.G., ALLENBY, P. y LESCH, M. (1981). "Rabbit cardiac immunoreactive cathepsin D content during starvation-induced atrophy". *Am. J. Physiol.*, 240, H222- H228.
- SANAHUJA, J.C. y HARPER, A.E. (1963). "Effect of dietary amino acid pattern on plasma amino acid pattern and food intake". *Am. J. Physiol.*, 204, 686-690.
- SANCHEZ, A., SWEDSEID, M.E., CLARK, A.J. y UMEZAWA, C. (1972). "Amino acid pools and hepatic enzymes activities in rats fed a meal of high or low methionine content". *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 550-554.
- SANDBERG, M., HAGBERG, H., JACOBSON, I., KARISSEN, B., LEHMANN, A. y HAMBERGER, A. (1987). "Analysis of amino acids: Neurochemical application". *Life Sciences*, 41, 829-832.
- SANTIDRIAN, S. (1981). "Muscle protein break down in young rat fed on an energy-depleted diet". *Rev. Exp. Fisiol.*, 37, 23-30.
- SAUBERLICH, H.E. (1961). "Studies on the toxicity and antagonism of amino acids for weanling rats". *J. Nutr.*, 75, 61-72.
- SAUBERLICH, H.E. y CANHAM, J.E. (1973). "Vitamina B₆". En: "Modern nutrition in health and disease". Eds. R.S. Goohart y M.E. Shilds. Filadelfia. Pag. 210-220.
- SAUBERLICH, H.E., CANHAM, J.E., BAKER, E.M., RAICA, N., Jr. y HERMAN, Y.F. (1972). "Biochemical assessment of the nutritional status of vitamin B₆ in the human". *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 629.
- SAUBERLICH, H.E., DOWDY, R.P. y SKALA, J.H. (1973). "Laboratory tests for the assessment of nutritional status". *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 4, 215.
- SCALFI, L., CONTALDO, F., BORRELLI, R., DE CATERINA, M., SPAGNUOLO, G., ALFIERI, R., MANCINI, M. (1987). "Protein balance during very-low-calorie diets for the treatment of severe obesity". *Ann. Nutr. Metab.*, 31, 154-159.
- SCHARRER, E., BAILE, C.A. y MAYER, J. (1970). "Effect of amino acids and protein on food intake of hyperphagic and recovered aphagic rats". *Am. J. Physiol.*, 218, 400-404.
- SCHOLZ-AHRENS, K.E., HAGEMEISTER, H., UNSHELM, J., AGERGAARD, N. y BARTH,

- C.A. (1990). "Response of hormones modulating plasma cholesterol to dietary casein or soy protein in minipigs". *J. Nutr.*, 120, 1387-1392.
- SCHÜLLER, A. (1980). "Nutrición. Consideraciones generales. Desnutrición proteica. Adelgazamiento". En: "Medicina interna". Paz Montalvo. Ed. A. Schüller Perez. España. Pag. 1069-1083.
 - SCHÜLLER, A. (1980a). "Páncreas endocrino. Consideraciones anatomofuncionales". En: "Medicina interna". Paz Montalvo. Ed. A. Schüller Perez. España. Pag. 960-977.
 - SEELIG, H.P. y WUEST, H. (1969). "Creatinine determination by the Jaffe reaction". *Arstl. Lab.*, 15, 34-39.
 - SEIDEL, J.C., NATH, N. y HARPER, A.E. (1960). "Diet and cholesterolemia: V. Effect of sulfur-containing amino acids and protein". *J. Lipid. Res.*, 1, 474-481.
 - SEMON, B.A., LEUNG, P.M.B., ROGERS, Q.R. y GIETZEN, D.W. (1989). "Plasma and brain ammonia and amino acids in rats measured after feeding 28% casein or 28: Egg white". *J. Nutr.*, 119, 1583-1592.
 - SERRA, I., HAMBERGER, A., RAGONESE, P. y GIUFFRIDA, A.M. (1982). "Effect of undernutrition on DNA and RNA synthesis in subcellular fractions from different regions of the developing rat brain". *Neurochemical Research*, 7, 8, 887-904.
 - SERSHEN, H. y LAJTHA, A. (1976). "Capillary transport of amino acids in the developing brain". *Exp. Neurol.*, 53, 465-474.
 - SHARMA, K.W., ANAND, B.K., DUA, S. y SINGH, B. (1961). "Role of stomach in regulation of activities of hypothalamic feeding centers". *Am. J. Physiol.*, 201, 593-598.
 - SIDRANSKY, H. y BABA, T. (1960). "Chemical pathology of acute amino acid deficiencies. III. Morphologic and biochemical changes in young rats fed valine or lysine devoid diets". *J. Nutr.*, 70, 463-483.
 - SIDRANSKY, H. y FARBER, E. (1958). "Chemical pathology of acute amino acid deficiencies. I. Morphologic changes in immature rats fed threonine, methionine or histidine devoid diets". *Arch. Pathol.*, 66, 119-134.
 - SIEBERT, G., GESSNER, B. y KLASSER, M. (1986). "Energy supply of the central nervous system". *Biblthca Nutr. Dieta*, 38, 1-26.
 - SINGH, U.K., AGARWAL, K.N. y SHANKER, R. (1990). "Effect of undernutrition on succinate dehydrogenase and acetylcholinesterase in developing rat brain". *Indian J. Exp. Biol.*, 28, 868-870.

- SLOW, Y.L. y DAKSHINAMURTI, K. (1985). "Aromatic L-amino acid decarboxylase in adult rat brain". *Can. Fed. Biol. Soc.*, 28, PA-129.
- SMART, J.L. (1984). "Animal models of early malnutrition: Advantages and limitations". En: "Malnutrition and behavior: Critical assessment of key issues". Eds. J. Brozek y B. Schurch. Switzerland. Nestle Foundation. Pag. 444-464.
- SMITH, D.M. y DRUSE, M.J. (1982). "Effects of maternal protein deficiency on synaptic plasma membranes in offspring". *Dev. Neurosci.*, 5, 403-411.
- SMITH, E.B. y JOHNSON, B.C. (1967). *Bri. J. Nutr.*, 21, 17-27. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Bri. J. Nutr.*, 54, 499-508.
- SMITH, J.E. y LUNN, P.G. (1984). "Albumin-synthesizing capacity of hepatocytes isolated from rats fed diets differing in protein and energy content". *Ann. Nutr. Metab.*, 28, 281-287.
- SMITH, Q.R., MOMMA, S., AOYAGI, M. y RAPOPORT, S.I. (1987). "Kinetics of neutral aminoacid transport across the blood-brain barrier". *J. Neurochem.*, 49, 1651-1658.
- SMITH, Q.R., TAKASATO, Y., SWEENEY, D.J. y RAPOPORT, S.L. (1985). "Regional cerebrovascular transport of leucine as measured by the in situ brain perfusion technique". *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 5, 300-311.
- SNYDER, S.H., YOUNG, A.B., BENNET, J.P. y MULDER, A.H. (1973). "Synaptic biochemistry of amino acids". *Fed. Proc.*, 32, 2039-2047.
- SOARES, M.J. y SHETTY, P.S. (1991). "Basal metabolic rates and metabolic economy in chronic undernutrition". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 45, 363-373.
- SOEMITRO, S., BLOCK, K.P., CROWELL, P.L. y HARPER, A.E. (1989). "Activities of branched-chain amino acid degrading enzymes in liver from rats fed different dietary levels of protein". *J.Nutr.*, 119, 1203-1212.
- SOKOLOFF, L. (1981). "Circulation and energy metabolism of the brain". En: "Basic neurochemistry". 3ª edición. Boston: Little, Brown. Ed. G.J. Seigel, R.W. Albers, B.W. Agranoff y R. Katzman. Pag. 471-495.
- SOKOLOFF, L. (1973). "Metabolism of ketone bodies by the brain". *Annu. Rev. Med.*, 24, 271-280.
- SOKOLOFF, L., FITZ GERALD, G.G. y KAUFMAN, E.E. (1977). "Cerebral nutrition energy

metabolism". En: "Nutrition and the brain". Eds. R.J. Wurtman y J.J. Wurtman. Raven Press. New York. Vol. 1, pag. 87-139.

- SOUBA, W.W. (1991). "Glutamine: A key substrate for the splanchnic bed". *Ann. Rev. Nutr.*, 11, 285-308.

- SOUBA, W.J., SMITH, R.J. y WILMORE, W.D. (1985). "Glutamine metabolism by the intestinal tract". *Jpen.*, 9, 608-617.

- SOURKES, T.L. (1979). "Nutrients and the cofactors required for monoamine synthesis in nervous tissues". En: "Nutrition and the brain". Ed. R.J. Wurtman. Raven Press. New York. Vol. 3, pag. 265-299.

- SPECTOR, R., COAKLEY, G. y BLAKELY, R. (1980). "Methionine recycling in the brain: A role for folates and vitamin B₁₂". *J. Neurochem.*, 34, 132-137.

- SPECTOR, S.R., GORDON, R., SJOERDSMA, A. y UDENFRIEND, S. (1967). "End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis". *Mol. Pharmacol.*, 3, 549-559.

- STANDARD, K.L., WILLIS, V.G. y WATERLOW, J.C. (1959). *Am. J. Clin.*, 7, 271.

- STATE UNIVERSITY OF IOWA. (1943a). "Growth curves for boys from birth six years" (prepared from data compiled by Iowa Child Welfare Research Station). Iowa.

- STATE UNIVERSITY OF IOWA. (1943b). "Growth curves for girls from birth to six years" (prepared from data compiled by Iowa Child Welfare Research Station). Iowa.

- STEKOL, J.A., WEISS, S., ANDERSON, E.I., HSU, P.T. y WATJEN, A. (1957). "Vitamin B₁₂ and folic acid in relation to methionine synthesis from betain in vivo and in vitro". *J. Biol. Chem.*, 226, 95-102.

- STEPHEN, J.M.L. (1968a). "Adaptative enzyme changes in liver and muscle of rats during protein depletion and refeeding". *Br. J. Nutr.*, 22, 153-163.

- STEPHEN, J.M.L. y WATERLOO, J.C. (1968b). "Effect of malnutrition on activity of two enzymes concerned with amino acid metabolism in human liver". *Lancet*, 1, 118-119.

- STEWART, A., LAIDLAW, Ph.D. y KOPPLE, J.D. (1987). "New concepts of the indispensable amino acids". *M. J. Clin. Nutr.*, 46, 593-605.

- STURMAN, J.A. (1987). "Sulfur amino acids in brain development". En: "Basic and clinical

aspects of nutritional and brain development". Eds. D.K. Rassin, B. Haber y B. Drujan. New York. Vol. 16, pag. 245-254.

- STURMAN, J.A., GAULL, G.E. y RAIHA, N.C.R. (1970). "Absence of cystathionase in human fetal liver: Is cystine essential?". Science, 169, 74-76.

- SUBERVILLE, C., HIGUERET, P., TARUOURA, D. y GARCIN, H. (1988). "Glutathione deficiency and peripheral metabolism of thyroid hormones during dietary cysteine deprivation in rats". Brit. J. Nutr., 59, 451-456.

- SUGANO, M., ISHIDA, T. y KOBAYASHI, K. (1988). "Protein-fat interaction on serum cholesterol level, fatty acid desaturation and eicosanoid production in rats". J. Nutr., 118, 548-554.

- SUGANO, M., ISHIWAKI, N., NAGATA, Y. y IMAIZUME, K. (1982). "Effect of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagon in rats". Brit. J. Nutr., 48, 211-221.

- SUGIYAMA, K., AKAI, H. y MURAMATSU, K. (1986b). "Effects of methionine and related compounds on plasma cholesterol level in rats fed a high cholesterol diet". J. Nutr. Sci. Vitaminol., 32, 537-549.

- SUGIYAMA, K., KUSHIMA, Y. y MURAMATSU, K. (1985). "Effects of sulfur-containing amino acids and glycine on plasma cholesterol level in rats fed on a high cholesterol diet". Agric. Biol. Chem., 49, 3455-3461.

- SUGIYAMA, K., OHISHI, K. y MURAMATSU, K. (1987). "Effect of dietary glutathione on plasma and liver lipid levels in rats fed on a high cholesterol diet". Agric. Biol. Chem., 51, 1061-1066.

- SUGIYAMA, K., OHKAWA, S. y MURAMATSU, K. (1986a). "Relationship between amino acid composition of diet and plasma cholesterol level in growing rats fed a high cholesterol diet". J. Nutr. Vitaminol., 32, 413-423.

- SUZIC, S., RADUNOVIC, L., JANKOVIC, V. y SEGOVIC, R. (1987). "Effect of protein-free diet in amino acid homeostasis of rat blood plasma and gut contents". Febs Letter 04731, 216, 2, 287-290.

- SVED, A.F. (1983). "Precursor control of the function of monoaminergic neurons". En: "Nutrition and the brain". Ed. R.J. Wurtman. Raven Press. New York. Vol. 6, pag. 224-275.

- SVED, A.F. y FERNSTROM, J.D. (1981). "Tyrosine availability and dopamine synthesis in the striatum: Studies with gamma-butyrolactone". Life Sci., 29, 743-748.

- SWENDSEID, M.E., KOPPLE, J.D. (1975). "Amino acid requirements and nonspecific nitrogen". *Infusionstherapie*, 2, 203-207.
- TACKMAN, J.M., TEWS, J.K. y HARPER, A.E. (1990). "Dietary disproportions of amino acids in the rat: Effects on food intake, plasma and brain amino acids and brain serotonin". *J. Nutr.*, 120, 521-533.
- TALLAN, H.H., RASSIN, D.K., STURMAN, J.A. y GAULL, G.E. (1983). "Methionine metabolism in brain". En: "Handbook of neurochemistry". Ed. A. Lajtha. 2ª edición. Plenum Publishing. New York. Vol. 3, pag. 535-558.
- TANAKA, A. y BANNAI, S. (1984). "Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture". *J. Biol. Chem.*, 259, 2441-2445.
- TANAKA, H., FUKUSHIMA, T., NAKATOMI, Y. y OGURA, M. (1988). "Metabolism of valine and isoleucine in growing rats at various dietary protein levels". *Agric. Biol. Chem.*, 52, 811-817.
- TANAKA, K. y ICHIARA, A. (1983). "Different effect of amino acid deprivation on synthesis of intracellular and extracellular proteins in rat hepatocytes in primary culture". *J. Biochem.*, 94, 1339-1348.
- TANAKA, H., NAKATOMI, Y., MORI, M. y OGURA, M. (1990). "Metabolism of methionine and cysteine in growing rats at various dietary protein levels". *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2093-2099.
- TANAKA, H., NAKATOMI, Y. y OGURA, M. (1987). "Metabolism of glycine and threonine in growing rats at various dietary protein levels". *Agric. Biol. Chem.*, 51, 3087-3093.
- TANAKA, K. y SUGANO, M. (1989). "Effect of addition of sulfur-containing amino acids and glycine to soybean protein and casein on serum cholesterol levels of rats". *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35, 323-332.
- TATEISHI, N., HIGASHI, T., NARUSE, A., NAKASHIMA, K., SHIOZAKI, H. y SAKAMOTO, H. (1977). "Rat liver glutathione: Possible role as a reservoir of cysteine". *J. Nutr.*, 107, 51-60.
- TAWA, N.E.Jr. (1984). "Metabolic consequences of protein deficiency and starvation". Ph.D. Thesis. Harvard University.
- TEMLER, R.S., DORMOND, Ch.A. y SIMON, E. (1983). "Alterations in hepatic enzyme activities in rats fed increased levels of soya protein with or without methionine supplementation". *Nutr. Rep. Int.*, 28, 253-265.
- TEWS, J.K., BRADFORD, A.M. y HARPER, A.E. (1981). "Induction of lysine imbalance in rats: Relation to competition for lysine transport into the brain in vitro". *J. Nutr.*, 111, 954-967.

- TEWS, J.K., GOOD, S.S. y HARPER, A.E. (1978). "Transport of threonine and tryptophan by rat brain slices: Relation to other amino acids at concentrations found in plasma". *J. Neurochem.*, 31, 581-589.
- TEWS, J.K., GREENWOOD, J., PRATT, O.E. y HARPER, A.E. (1988). "Dietary aminoacid analogues and transport of lysine or valine across the blood-brain barrier in rats". *J. Nutr.*, 118, 756-763.
- TEWS, J.K., GREENWOOD, J., PRATT, O.F. y HARPER, A.E. (1987a). "Threonine entry into brain after diet-induced changes in plasma aminoacids". *J. Neurochem.*, 48, 1879-1886.
- TEWS, J.K., GREENWOOD, J., PRATT, O.F. y HARPER, A.E. (1987b). "Valine entry into rat brain after diet-induced changes in plasma aminoacids". *Am. J. Physiol.*, 252, R78-R84.
- TEWS, J.K. y HARPER, A.E. (1983). "Atypical amino acids inhibit histidine, valine or lysine transport into rat brain". *Am. J. Physiol.*, 245 (Regulatory integrative comp. physiol. 14), R556-R563.
- TEWS, J.K., KIM, Y.W.L. y HARPER, A.E. (1980). "Induction of threonine imbalance by dispensable amino acids: Relationships between tissue amino acids and diet in rats". *J. Nutr.*, 110, 394-408.
- THAKUR, V.S., THAKUR, V., SINGH, O., MITTAL, A., KARMAKAR, M.G. y AHUJA, M.M.S. (1988). "Protein calorie malnutrition: Is the basic anomaly in insulin secretion or tissue receptors?". *Diabetologia*, 31, 403-405.
- THEALL, C.C., WURTMAN, J.J. y WURTMAN, R.J. (1984). "Self-selection and regulation of protein: Carbohydrate ratio in foods adult rats eat". *J. Nutr.*, 114, 711-718.
- THIEDE, H.M. y KEHR, W. (1981). "Endogenous dopa in rat brain: Occurrence, distribution and relationship to changes in catecholamines synthesis". *Naunyn-schmeideberg's Arch Pharmacol.*, 316, 299-303.
- THURMOND, J.B., FREEMAN, G.B., SOBLOSKY, J.S., IENI, J.R. y BROWN, J.W. (1990). "Effect of dietary tyrosine on L-dopa and amphetamine-induced changes in locomotor activity and neurochemistry in mice". *Pharmacol. Biochem. and Behavior*, 37, 259-266.
- TISELIUS, A. y FLODIN, P. (1953). "Zone electrophoresis". En: "Advances in protein chemistry". Academic Press. Vol. 8, 4, pag. 461.
- TOTH, J., LAJTHA, A. (1980). "Effect of protein-free diet on the uptake of amino acids by the brain in vivo". *Exp. Neurol.*, 68, 443-452.

- TRINDER, P. (1969a). "Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor". *Ann. Clin. Biochem.*, 6, 24-27.
- UDENFRIEND, S. (1966). "Tyrosine hydroxylase". *Pharmacol. Rev.*, 18, 43-51.
- UDENFRIEND, S., ZALTZMAN-NIRENBURG, P. y NAGATSU, T. (1965). "Inhibitors of purified beef adrenal tyrosine hydroxylase". *Biochem. Pharmacol.*, 14, 837-845.
- U.S.D.H.E.W. (United States Department of Health, Education and Welfare). (1972). Ten state nutritional survey 1968/1970. I, Historical development; II, Demographic data; III, Clinical, Anthropometry, Dental; IV, Biochemical; V, Dietary; and Highlights, USDHEW Publ.Nos. (HMS) 72-8130, -8131, -8132, -8133, -8134.
- U.S.D.H.E.W. (United States Department of Health, Education and Welfare). (1953). "Basic body measurements of school age children". Office of Education. Washington, D.C.
- VAN BALGOOY, J.N.A., MARSHALL, F.D. y ROBERTS, E. (1972). "Metabolism of intracerebrally administered histidine, histamine and imidazoleacetic acid in mice and frogs". *J. Neurochem.*, 19, 2341-2353.
- VAN ZWEITEN, P.A. (1973). "The central action of antihypertensive drugs mediated via central α -receptors". *J. Pharm. Pharmac.*, 25, 89-95.
- VARELA, G. (1989). "Proteína". En: "Problemas de la nutrición en las sociedades desarrolladas". Salvat. Eds. J. Saenz, L. Gonzalez y J.J. Goiriena. España. Pag. 37-44.
- VELU, J.G., SCOTT, H.M. y BAKER, D.H. (1972). "Body composition and nutrient utilization of chicks fed amino acid diets containing graded amounts of either isoleucine or lysine". *J. Nutr.*, 102, 741-748.
- VELLAS, B., CONCEICAO, J. LAFONT, CH., FONTAN, B. GARRY, F.J., ADDUE, D. y ALBAREDE, J.L. (1990). "Malnutrition and falls". *The lancet*, 336, 8728, 1447.
- VISEK, W.J. (1984). "An update of concepts of essential amino acids". *Ann. Rev. Nutr.*, 4, 137-155.
- WAELSCH, H., LAJTHA, A. (1961). "Protein metabolism in the nervous system". *Physiol. Rev.*, 41, 709-736.
- WAGLE, D.S., MARFATIA, U. y SREENIVASAN, A. (1962). *Brit. J. Nutr.*, 16, 369.
- WALTERS, J.R. y ROTH, R.H. (1976). "Dopaminergic neurons-alteration in the sensitivity of

- tyrosine hydroxylase to inhibition by endogenous dopamine after cessation of impulse flow". *Biochem. Pharmacol.*, 25, 649-654.
- WALTON, M.J., COWEY, C.B. y ADRON, J.W. (1982). "Methionine metabolism in rainbow trout fed diets of differing methionine and cystine content". *J. Nutr.*, 112, 1525-1535.
 - WALLWORK, J.C., BOTNEN, J.H. y SANDSTEAD, H.H. (1982). "Effect of dietary zinc on rat brain catecholamines". *J. Nutr.*, 112, 514-519.
 - WANG, S.Y., HALBAN, P.A. y ROWE, J.W. (1988). "Effect of aging on insulin synthesis and secretion". *J. Clin. Inv.*, 81, 176-184.
 - WATERLOO, J.C., GARLICK, P.J. y MILLWARD, D.J. (1978). "The effects of nutrition and hormones on protein turnover in muscle, in protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 625-695.
 - WATERLOW, J.C. (1986). "Metabolic adaptation to low intakes of energy and protein". *Am. Rev. Nutr.*, 6, 495-526.
 - WATERLOW, J.C., NEALE, R.J., ROWE, L. y PALIN, I. (1972). "Effects of diet and infection on creatine turnover in the rat". *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 371-375.
 - WEEKES, T.E.C. (1986). "Insulin and growth". En: "Control and manipulation of animal growth". Butterworths. Eds. P.J. Buttery, D.B. Lindsay y N.B. Haynes. London. Cap. 12, pag. 187-206.
 - WEINER, N., CLOUTHIER, G., BJUR, R. y PFEFFER, I. (1972). "Modification of norepinephrine synthesis in intact tissues by drugs and during short-term adrenergic nerve stimulation". *Pharmacol. Rev.*, 24, 203-221.
 - WELCHSELBANM, T.E. (1946). *Am. J. Clin. Path.*, 16, 40.
 - WERMAN, R. (1966). "A review- criteria for identification of a central nervous system transmitter". *Comp. Biochem. Physiol.*, 18, 745-766.
 - WETZEL, N. (1940). "The wetzel grid for evaluating physical fitness". National Education Association. Cleveland Heights, Ohio.
 - WHITEHEAD, R.G., COWARD, W.A., LUNN, P.G. (1973). "Serum-albumin concentrations and the onset of kwashiorkor". *Lancet* i, 63.
 - WIDHALM, K., ZWIAUER, K., HADLE, M. y ROTH, E. (1989). "Plasma concentrations of free amino acids during 3 weeks treatment of massively obese children with a very low calorie diet". *Eur. J. Pediatr.*, 149, 43-47.

- WIGGINS, R.C., BENJAMINS, J.A., KRIGMAN, M.R. y MORELL, P. (1974). "Synthesis of myelin proteins during starvation". *Brain Res.*, 80, 345-349.
- WIGGINS, R.C., FULLER, G.N. y BELL, M.E. (1979). *J. Neurochem.*, 31, 1579.
- WILLIAMSON, D.H. (1987). "Brain substrates and the effects of nutrition". *Proceeding of the Nutrition Society*, 46, 81-87.
- WILLMAN, W. P., SWANSON, P.P., STEWART, G.F., STEVENSON, G.T. y BRUSH, M. (1945). "Biological efficiency of egg protein". *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 4, 164.
- WINDMUELLER, H.G. (1982). "Glutamine utilization by the small intestine". *Adv. Enzymol.*, 53, 202-232.
- WOFSEY, A.R., KUCHAR, M.J. y SNYDER, S.H. (1971). "A unique synaptosomal fraction which accumulates glutamic and aspartic acids in brain tissue". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68, 1102-1106.
- WOODGER, T.L., SIREK, A. y ANDERSON, G.H. (1979). "Diabetes, dietary tryptophan, and protein intake regulation in weanling rats". *Am. J. Physiol.*, 236, R307-R311.
- WURTMAN, R.J. y FERNSTROM, J.D. (1975). "Control of brain monoamine synthesis by diet and plasma amino acids". *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 638-647.
- WURTMAN, R.J., HEFTI, F. y MELAMED, F. (1981). "Precursor control of neurotransmitter synthesis". *Pharmacol. Rev.*, 32, 315-335.
- WURTMAN, R.J., HEFTI, F. y MELAMED, E. (1980). "Precursor control of neurotransmitter synthesis". *Pharmacol. Rev.*, 32, 315-335.
- WURTMAN, R.J., LARIN, F., MOSTAFAPOUR, S. y FERNSTROM, J.D. (1974). "Brain catechol synthesis: Control by brain tyrosine concentration". *Science*, 185, 183-184.
- YAGASAKI, K., AOKI, T. y FUNABIKI, R. (1986). "Serum and lipid responses to methionine and cystine in rat fed diets with different casein levels". *Nutr. Res. Int.*, 34, 59-66.
- YALOW, R.S. y BERGSON, S.A. (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man". *J. Clin. Invest.*, 39, 1159-1175.
- YALOW, R.S. y BERGSON, S.A. (1959). "Assay of plasma insulin in human subject by immunological methods". *Nature*, 184, 1648-1649.
- YALOW, R.S. y BERGSON, S.A. (1956). "Effects of X rays on trace-labeled I-131 insulin and its relevance to biologic studies with I-131 labeled proteins". *Radiology*, 66, 106.

- YAMAGUCHI, K. (1990). "Nutrition and metabolism of sulfur aminoacids". En: "Nutrition: Protein and amino acids". Eds. A. Yoshida, H. Naito, Y. Niiyama y T. Suzuki. Japan. Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer, Berlin. Pag. 165-183.
- YAMASAKI, Y. y NATORI, Y. (1972). "Sex difference in the liver and plasma free amino acid concentrations in rats". J. Biochem., 72, 491-493.
- YAMASHITA, K y ASHIDA, K. (1969). J. Nutr., 99, 267-273. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". Bri. J. Nutr., 54, 499-508.
- YAMAUCHI, T. y FUJISAWA, H. (1979). "Regulation of bovine adrenal tyrosine 3-monooxygenase by phosphorylation-dephosphorylation reaction catalized by adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase and phosphorprotein phosphatase". J. Biol. Chem., 254, 6408-6413.
- YAP, S.H. y HAFKENSCHIED, J.C.M. (1981). "Effect of starvation on the synthesis rate of albumin in vivo and its relation to concentrations of amino acids in the peripheral blood, the portal circulation and in the liver cytosolic fraction". Ann. Nutr. Metab., 25, 158-164.
- YOKOGOSHI, H. (1985). "Effect of dietary level of protein or methionine and threonine on the amino acids and catecholamines in brain of rats fed a high tyrosine diet". J. Nutr. Sci. Vitaminol., 31, 519-531.
- YOKOGOSHI, H., MORITOKI, K. y YOSHIDA, A. (1974). "Effect of supplementation of methionine and threonine to a nonprotein diet on the protein catabolism of rats". Nutr. Rep. Int., 10, 371-380.
- YOKOGOSHI, H. y YOSHIDA, A. (1976). "Some factors affecting the nitrogen sparing action of methionine and threonine in rats fed a protein free diet". J. Nutr., 106, 48-57.
- YOKOYAMA, M. y NAKAZOE, J. (1991). "Effects of dietary protein levels on free amino acid and glutathione contents in the tissues of rainbow trout". Comp. Biochem. Physiol., 99A, 1/2, 203-206.
- YOSHIDA, A. y ASHIDA, K. (1969). Agr. Biol. Chem., 33, 43-49. Citado en: HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". Bri. J. Nutr., 54, 499-508.
- YOSHIDA, A., HARPER, A.E. y ELVEHJEN, C.A. (1957). J. Nutr., 63, 555.
- YOSHIDA, A. y MORITORI, K. (1974). "Nitrogen sparing action of methionine and threonine in rats receiving a protein free diet". Nutr. Rep. Int., 9, 159-168.

- YODIN, M.B.H., GREEN, A.R., BLOOMFIELD, M.R., MITCHELL, B.D., HEAL, D.J. y GRAHAME-SMITH, D.G. (1980). "The effects of iron deficiency on brain biogenic monoamine biochemistry and function in rats". *Neuropharmacol.*, 19, 259-267.
- YOUNG, V. R. y BIER, D.M. (1987). "A kinetic approach to the determination of human amino acid requirements". *Nutr. Rev.*, 45, 10, 289-298.
- YOUNG, G. y HILL, G.L. (1981). "Evaluation of protein energy malnutrition in surgical patients from plasma valine and other amino acids, proteins and anthropometric measurements". *An. J. Clin. Nutr.*, 34, 166-172.
- YOUNG, V.R., MARCHINI, J.S. y CORTIELLA, J. (1990). "Assessment of protein nutritional status". *J. Nutr.*, 120, 1496-1502.
- YOUNG, V.R., MEREDITH, C., HOERR, R., BIER, D.M. y MATTHEWS, D.E. (1985a). "Amino acids and kinetics in relation to protein and amino acid requirements: The primary importance of amino acid oxidation". En: "Substrate and energy metabolism in man". Eds. I.S. Garrow y D. Halliday. Londres. Pag. 119-133.
- YOUNG, V.R., MOLDAWER, L.L., HOERR, R. y BIER, D.M. (1985b). "Mechanisms of adaptation to protein malnutrition". En: "Nutritional adaptation in man". Eds. K.S. Blaxter y J.C. Waterlow. Londres. Pag. 189-215.
- YOUNG, U.R. y PELLETT, P.L. (1987). "Protein intake and requirements with reference to diet and health". *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 1323-1343.
- YOUNG, U.R., STEFFEE, W.P., PENCHARZ, P.B., WINTERER, J.C. y SCRIMSHAW, N.S. (1975). "Total human body protein synthesis in relation to protein requirements at various ages". *Nature*, 253, 192-194.
- YU, B.P., MASORO, E.J., MURATA, I., BERTRAND, H.A. y LYND, F.T. (1982). "Life span study of SPF fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: Longevity, growth, lean body mass and disease". *J. Gerontol.*, 37, 130-141.
- YUDILEVICH, D.L., DeROSE, N. y SEPULVEDA, F.V. (1972). "Facilitated transport of amino acids through the blood-brain barrier of the dog studied in a single capillary circulation". *Brain Res.*, 44, 569-578.
- YUWILER, A. y GELLER, E. (1966). "Brain serotonin changes in phenylalanine fed rats: Synthesis, storage and degradation". *J. Neurochem.*, 16, 999-1005.
- YUWILER, A. y GELLER, E. (1965). "Serotonin depletion by dietary leucine". *Nature*, 208, 83-84.

- YUWILER, A. y LOUETTIT, R.T. (1961). "Effect of phenylalanine diet on brain serotonin in rat". *Science*, 134, 831-832.
- YUWILER, A., OLDENDORF, W.H., GELLER, E. y BRAUN, L. (1977). "Effect of albumin binding and amino acid competition on tryptophan uptake into brain". *J. Neurochem.*, 28, 1015-1023.
- ZAMENHOF, S., VaN MARTHENS, E. y GRAUEL, L. (1971). "DNA (cell number) and protein in neonatal rat brain: Alteration by timing of maternal dietary protein restrictions". *J. Nutr.*, 101, 1265-1270.
- ZIMMER, R. y LANG, R. (1975). "Rates of lactic acid permeation and utilization in the isolated dog brain". *Am. J. Physiol.*, 229, 432-437.
- ZLOTKIN, H.S. y ANDERSON, G.H. (1982). "The development of cystathionase activity during the first year of life". *Pediatr. Res.*, 16, 65-68.

Presidentes:

Dr. Ama H^e Reguejo

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que al

margen se expresa, para (jurar etc. todo doctoral,

Vocales:

Dr. Elena Vaz Ameyue

acordó por una unimidad calificarla

Dr. Antonio Gomez

Apto con laurea

Dr. Juan Carlos Stokert

Madrid, 9 de Marzo de 1893

El Secretario del Tribunal:

Secretario:

Dr. Rosa H^e Ortego Auto

Rosa H^e Ortego